

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045980**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента	(51) Int. Cl.	<i>A61P 27/02</i> (2006.01)
2024.01.24		<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
(21) Номер заявки		<i>A61P 31/14</i> (2006.01)
202291063		<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
(22) Дата подачи заявки		<i>A61P 35/02</i> (2006.01)
2020.10.07		<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
		<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
		<i>C07K 16/28</i> (2006.01)
		<i>A61K 39/00</i> (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ПОЛИОВИРУСА (PVR) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/912,534	(56) EP-A1-1481993
(32) 2019.10.08	WO-A1-2017149538
(33) US	
(43) 2022.07.11	
(86) PCT/IL2020/051082	
(87) WO 2021/070181 2021.04.15	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: НЕКТИН ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (IL)	
(72) Изобретатель: Албертс Филипп (NL), Джетха Ариф (CA), Франссон Йохан, Джеймиан Язен (US), Халме Джоанн (CA), Цукерман Пинсах (IL)	
(74) Представитель: Нилова М.И. (RU)	

(57) Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором полиовируса человека (PVR). Антитела применимы для лечения опухолей или рака.

B1

045980

**045980
B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение касается области иммунотерапии и относится к гуманизированным антителам, которые специфически связываются с человеческим рецептором полиовируса (PVR), содержащим определенные наборы CDR и последовательностей каркасных областей. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные гуманизированные антитела, и их применениям.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Рецептор полиовируса (PVR), также называемый CD155, представляет собой трансмембранный гликопротеин, вовлеченный в медиацию адгезии клеток к молекулам внеклеточного матрикса. Ранее он был описан как опухолевый антиген и как потенциальная мишень для терапевтического воздействия, поскольку его экспрессия повышается при нейроэктодермальных раках, включающих мультиформную глиобластому, медуллобластому и карциному толстой и прямой кишки (Solecki et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 25697-700), а также при раке поджелудочной железы (Nishiwada et al., *Anticancer Res.* 2015, 35(4): 2287-97). Также известно, что PVR усиливает индуцированную сывороткой активацию сигнального пути Ras-Raf-MEK-ERK, активируя циклины D2 и E и подавляя p27Kipl, что в конечном итоге сокращает продолжительность фазы G0/G1 клеточного цикла. (Kakunaga 2004, *J. Biological Chemistry*, 279, 36419-36425. По этой причине ожидается, что блокирование PVR на опухолевых клетках снижает их жизнеспособность. PVR также играет критическую роль в ангиогенезе, и предполагается, что он регулирует VEGF-индуцированный ангиогенез посредством контроля взаимодействия рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2) с $\alpha(v)\beta(3)$ интегрином и опосредованного VEGFR2 сигнального пути Rap1-Akt (Kinugasa et al., 2012, *Circ Res.* 2012, 110(5), 716-26). Кроме того, PVR образует комплекс с IGF1R и участвует в передаче сигнала тирозин-протеинкиназы Met (сMet), и блокирование образования комплекса снижает жизнеспособность клеток и ангиогенез (Lee et al., *Scientific Reports* 2014, 20, 4, 7139).

В последние годы стало очевидно, что PVR является важным лигандом иммунной контрольной точки (Brilc PK et al. 2019 *Cell Mol Immunology*). Экспрессия PVR повышается как в злокачественных клетках, так и в инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках, у людей и мышей. У мышей PVR-/- наблюдается снижение роста опухоли и метастазирование за счет активации DNAM-1 (CD226) и усиления эффекторной функции CD8+ T- и NK-клеток, соответственно. Блокада белка-1 программируемой гибели клеток (PD-1) или обоих: PD-1 и цитотоксического T-лимфоцитарного антигена 4 (CTLA4) более эффективна в условиях, когда количество PVR было ограничено, что свидетельствует о клиническом потенциале комбинированной терапии с использованием PD-1/PD-L1 и блокады PVR (LI XY et.al *JCI*2018). Более того, в клинических условиях экспрессия PD-L1 и PVR регулируется независимо, что позволило разделить пациентов, получавших терапию анти-PD-1-антителом, на 4 группы в зависимости от уровней экспрессии PD-L1 и PVR. Высокая экспрессия PVR у пациентов с низкой экспрессией PD-L1 улучшала состояние не отвечающих на терапию. Это было дополнительно подтверждено с использованием генно-инженерной модели рака. Эти результаты подтверждают значение PVR, как важной иммунной контрольной точки в иммунотерапии опухолей (Lee BR et al. *JCI. Insight*, 2020). Участие PVR в метастазировании было продемонстрировано посредством инъекции раковых клеток в хвост мышей и измерения метастазов в легких. Было показано, что активированный PVR в раковых клетках перекрестно взаимодействует со своим контррецептором в тромбоцитах, и что такое перекрестное взаимодействие усиливает метастазирование раковых клеток в легкие (Morimoto et al., *Oncogene* (2008) 27, 264-273).

В публикации WO 2017149538 одного из авторов настоящего изобретения описаны мышинные антитела и их фрагменты, которые связываются с PVR, а также кодирующие их полинуклеотидные последовательности и клетки гибридомы, продуцирующие эти антитела.

В публикации заявки на выдачу патента США № 20070041985 раскрываются молекулы, которые специфически связываются по меньшей мере с одним внутри- или внеклеточным доменом PVR, причем молекула обладает способностью модулировать опосредованную рецептором адгезию, миграцию и/или инвазию клетки, экспрессирующей PVR или любое его производное.

В публикации заявки на выдачу патента США № 20090215175 предлагаются молекулы (например, низкомолекулярные химические соединения, олигонуклеотиды, полипептиды, антитела и фрагменты антител), которые модулируют функции PVR, необходимые для адгезии, миграции, инвазии и/или метастатического потенциала клеток. Указанные молекулы можно применять для лечения путем воздействия на клетки с метастатическим потенциалом, метастаза и рака.

Существует неудовлетворенная потребность в создании гуманизированных антител, распознающих человеческий PVR, которые являются более безопасными и более эффективными и могут использоваться в диагностических и терапевтических целях при заболеваниях, связанных с экспрессией PVR.

Сущность настоящего изобретения

В настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, описаны гуманизированные антитела, которые специфически связываются с человеческим рецептором полиовируса (PVR; CD155) и предотвращают связывание PVR по меньшей мере с одним из лигандов, Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM (TIGIT), CD96 и CD226 (DNAM-1). Гуманизированные антитела по настоящему изобретению, выбранные из большой коллекции клонов антител, обладают улучшенными свойствами по сравнению с другими известными анти-PVR антителами. Эти улучшенные свойства включают, но не ограничиваются следующими: сниженный потенциал иммуногенности, улучшенная аффинность связывания, активность и биофизические свойства, и улучшенная экспрессия. Поскольку связывание PVR с CD226 приводит к подавлению экспрессии CD226 на поверхности Т- и NK-клеток и снижению активности CD226 в отношении стимуляции Т- и NK-клеток и уничтожения опухолевых клеток, антитела по настоящему изобретению могут восстанавливать экспрессию и/или активность CD226 на этих клетках. Надлежащая экспрессия и функционирование CD226 обеспечивает более эффективное уничтожение опухоли иммунными клетками, в частности, CD8+ Т-клетками и NK-клетками.

Посредством комбинирования определенных наборов последовательностей участков CDR и последовательностей каркасных участков человека и введения определенных мутаций в эти последовательности для получения улучшенных антител с модифицированными вариabельными областями была получена большая коллекция гуманизированных антител. Новые разработанные гуманизированные вариabельные области сохраняют остатки, критически важные для поддержания конформации антитела и аффинности связывания, и в то же время имеют наименьшую частоту потенциальных Т-клеточных эпитопов, что сводит к минимуму риск нежелательного иммунного ответа на антитела. Описанные здесь антитела были сконструированы с учетом таких факторов, как гомология, Т-клеточные эпитопы, ключевые остатки и предсказанные структуры.

Варианты с комбинацией специфических человеческих каркасных областей и точечной мутации глутаминовой кислоты в аспарагин в последнем остатке CDR2 вариabельной области легкой цепи (позиция 56 согласно нумерации по Kabat), неожиданно демонстрируют сильное сродство к человеческому PVR и улучшенную иммунную активность.

Было обнаружено, что несколько вариантов гуманизированных антител по изобретению являются особенно подходящими для использования в химерных антигенных рецепторах (CAR), благодаря их более низкой аффинности, которая может быть полезна для нацеливания на опухолевые клетки с высокой экспрессией PVR без нацеливания на нормальные ткани.

Несколько вариантов гуманизированных антител по настоящему изобретению обеспечивают преимущество, состоящее в улучшенной технологичности, и могут быть получены с исключительно высоким выходом по сравнению с другими вариантами.

В настоящее время раскрыто, что гуманизированное антитело, описанное в настоящем документе, демонстрирует высокую эффективность в отношении стимуляции цитотоксических Т- и NK-клеток, а также при лечении рака на гуманизированных мышинных моделях, включая *in vivo* модели рака поджелудочной железы и рака легких.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает в некоторых вариантах осуществления высокоспецифичные неиммуногенные гуманизированные антитела против человеческого PVR, обладающие улучшенной аффинностью, активностью и/или воспроизводимостью.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, предложено гуманизированное антитело, которое специфически связывается с человеческим рецептором полиовируса (PVR, CD155) или его фрагментом, содержащим по меньшей мере антигенсвязывающий сайт, причем антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит вариabельную область с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и где легкая цепь содержит вариabельную область с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность вариabельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, соответствующие SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность вариabельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, соответствующие SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело IgG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизированное моноклональное антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из IgG4 и IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело или его фрагмент относится к подклассу IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к подклассу IgG1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его фрагмент содержат константную область человеческого IgG4, имеющую замену S228P (также называемую S241P) в шарнирной области.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело, Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QVQLVQSGAE(L/V)KKPGASVK(I/V)SCKATGYTFSNYWIEW(I/V)(K/R)QAPGQGLEW(I/M)GEIFPGSG RINFNEKFKGR(A/V)TFTADTSI(D/S)T(T/A)YM(Q/E)LS(S/R)L(T/R)SDD(S/T)AVYYCARTKIYGNISFDY WGQGT(T/L)VTVSS (SEQ ID NO: 47); и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DI(M/Q)MTQSPS(F/S)LSASVGDRTITC(K/R)ASQDVGTA(V/A)WYQQKPKAPK(L/S)LIYWASSRHE GVP(D/S)RF(T/S)GSGSGTDFLTISLQ(S/P)EDFA(D/T)YFCQQYSRYPLT FGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 48).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую: i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 10-12; и ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков тяжелой цепи (FR):

- (A) FR-H1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 22 и 26;
- (B) FR-H2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 23 и 28;
- (C) FR-H3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 24, 27 и 29; и
- (D) FR-H4, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и 25.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую:

i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13-15; и

ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков легкой цепи:

- (A) FR-L1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 34;
- (B) FR-L2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31 и 37;
- (C) FR-L3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 35 и 36; и (D) FR-L4 представляющий собой SEQ ID NO: 33.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит:

i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 10-12; и

ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков (FR) тяжелой цепи (HC):

- (A) FR-H1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 22 и 26;
- (B) FR-H2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 23 и 28;
- (C) FR-H3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 24, 27 и 29;
- (D) FR-H4, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и 25;

и переменная область легкой цепи содержит:

i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13-15; и ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков (FR) легкой цепи (LC):

- (A) FR-L1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 34;
- (B) FR-L2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31 и 37;
- (C) FR-L3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 35 и 36; и (D) FR-L4 представляющий собой SEQ ID NO: 33.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи гуманизированного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи гуманизированного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей

мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения переменная область тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения переменная область тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизованное антитело содержит комбинацию переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, где комбинация выбрана из группы, состоящей из:

- i) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2;
- ii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8;
- iii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2;
- iv) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8;
- v) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2;
- vi) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8;
- vii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6, и последовательности легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2; и
- viii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизованное антитело ингибирует связывание PVR по меньшей мере с одним из TIGIT, CD96 и CD226.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, указанное антитело ингибирует связывание PVR с TIGIT, CD96 и CD226.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело представляет собой антитело IgG4, содержащее последовательности тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 49, или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело представляет собой антитело IgG1, содержащее последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 50, или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизованное антитело содержит последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 49.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело проявляет улучшенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) по сравнению с другими известными антителами.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представлены в соответствии с другим аспектом изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи, переменной области легкой цепи или обеих, описанных выше.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложен полинуклеотид,

кодирующий вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложен полинуклеотид, кодирующий вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует гуманизированное антитело или его фрагмент, содержащие: вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. Каждая комбинация вариabельных областей тяжелой и легкой цепи представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариabельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-42, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариabельную область легкой цепи гуманизированного антитела, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-46, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну цепь гуманизированного антитела или ее фрагмент, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

Также описана линия клеток, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела по настоящему изобретению. Линия клеток предназначена для экспрессии гуманизированного антитела или его фрагмента, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линия клеток представляет собой линию клеток млекопитающего, такую как линия клеток яичника китайского хомячка (CHO).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, линия клеток представляет собой линию бактериальных, растительных, мышинных (например, NSO и Sp2/0), крысиных (например, YB2/0), хомячковых (например, BHK и CHO) или человеческих клеток (например, PER.C6).

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему внеклеточную часть (связывающий домен), содержащую любое из гуманизированных антител или их фрагментов, описанных в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложен CAR, содержащий комбинацию последовательностей вариabельных областей тяжелой и легкой цепей, описанных выше, обладающий уникальной комбинацией последовательностей CDR и каркасных участков, улучшенным связыванием и другими свойствами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, CAR содержит комбинацию вариabельных областей тяжелой и легкой цепей, причем вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит комбинацию вариabельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного антитела, где комбинация выбрана из группы, состоящей из:

- i) последовательности вариabельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и последовательности вариabельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;
- ii) последовательности вариabельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 3, и последовательности вариabельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;
- iii) последовательности вариabельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, и по-

следовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;

iv) последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9; и

v) последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6, и последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, CAR содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 6, и последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9, трансмембранный домен и внутриклеточный Т-клеточный сигнальный домен.

Согласно настоящему изобретению, также предложена одноцепочечная вариабельная область (scFv), содержащая вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, между вариабельными областями находится шарнирная область. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, аминокислотная последовательность scFv выбрана из SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 и их аналога, по меньшей мере на 90% идентичного любой из указанных последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит аминокислотные последовательности, представленные любой из SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, CAR содержит последовательность scFv и по меньшей мере один белковый домен, выбранный из группы, состоящей из CD8 Stalk домена, CD28 TM домена, 41BB домена и CD3 ζ , домена (CD3Z, Zetta). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, CAR содержит CD8 Stalk домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит CD28 TM домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит CD3Z домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит 41BB домен. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, CAR содержит CD8 Stalk домен, CD28 TM домен, 41BB домен и CD3Z домен.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, CAR содержит последовательность scFv, содержащую сайт связывания PVR любого антитела, описанного выше, и по меньшей мере один домен, выбранный из группы, состоящей из CD8 Stalk домена, CD28 TM домена, 41BB домена и CD3Z домена. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, CAR содержит последовательность scFv, содержащую сайт связывания PVR любого антитела, описанного выше, и CD8 Stalk домен, CD28 TM домен, 41BB домен и CD3Z домен.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложен лимфоцит, сконструированный для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложена Т-клетка, сконструированная для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления изобретения, предложена NK-клетка, сконструированная для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, предложена сконструированная Т-клетка, экспрессирующая последовательность scFv, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 или ее аналог, по меньшей мере на 90% идентичный любой из указанных последовательностей; домен CD8 Stalk, домен CD28 TM, домен 41BB и домен CD3Z.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного лимфоцита, содержащего CAR, описанного в настоящем документе. В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

Для доставки композиций по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, можно использовать любой способ введения, включая парентеральный и энтеральный способы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция составлена для инъекции или инфузии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция предназначена для внутриопухолевого введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция предназначены для применения для повышения экспрессии на поверхности и/или передачи сигналов CD226 на CD8+ и CD4+ Т-клетках.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция предназначены для применения при лечении рака у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из группы, со-

стоящей из рака легкого, рака толстой кишки, глиобластомы, рака надпочечников, рака матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и рака молочной железы. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, рак представляет собой гематологический рак.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гематологический рак выбран из лейкоза, включая острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый лимфолейкоз (ALL) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); лимфомы, включая болезнь Ходжкина, и неходжкинскую лимфому; и множественной миеломы.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, применение дополнительно включает применение агента, который подавляет активность или экспрессию иммунного коингибирующего рецептора.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, иммунный коингибирующий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIGIT, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, CD96, B7H5 (CD160), LAIR1, SIGLEC10, CD112R, CD112, ILT-4 и 2B4. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, применение также включает применение в комбинации с антителом против рецептора эндотелиального фактора роста (EGFR).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ увеличения экспрессии на поверхности и/или передачи сигналов CD226 в CD8+ и CD4+ Т-клетках индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD8+ Т-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль CD8+ Т-клетки.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложен способ лечения рака у индивидуума, нуждающегося в таком лечении, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой солидную опухоль. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления изобретения, рак представляет собой несолидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головы и шеи, рака яичников, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака предстательной железы и рака легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ лечения рака включает предотвращение или уменьшение образования, роста или распространения метастазов у субъекта.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения рака у индивидуума, страдающего раком, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции и ингибитора передачи сигналов PD-1, PD-L1, CTLA-4 или CD112R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головы и шеи, рака яичников, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака предстательной железы или рака легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор передачи сигнала PD-1 представляет собой антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент, связывающийся с PD-1, представляет собой пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их PD-1-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибитор передачи сигналов PD-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, которое специфически связывает PD-L1 или PD-L2, включает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их PD-L1 или PD-L2-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибитор передачи сигнала PD-1 содержит Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-слитый белок содержит AMP-224 или его PD-1-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибитор передачи сигнала PD-1 содержит низкомолекулярный ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит одно или более из следующих соединений: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил]метил]амино}этил}-ацетамид (BMS 202); (2-[(3-цианобензил)окси]-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (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-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-

триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1h-индол; L- α -глутамин; N6,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-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]-фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; глицинамид; 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-, циклический (1 \rightarrow 14)-тиоэфир; или их производные или аналоги.

В данном документе также описан способ получения композиции для лечения рака у индивидуума, страдающего раком, включающий смешивание гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и фармацевтически приемлемого эксципиента, носителя или разбавителя. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головы и шеи, рака яичников, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака предстательной железы и рака легких. В настоящем документе также описан способ получения гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий инкубацию описанной в настоящем документе клеточной линии в среде для культивирования клеток в условиях, достаточных для обеспечения экспрессии и секреции гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики или прогнозирования рака у субъекта, включающему определение уровня экспрессии PVR в биологическом образце указанного субъекта с использованием по меньшей мере одного описанного здесь гуманизованного антитела, фрагмента или scFv.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение также относится к способу детекции или количественного определения экспрессии PVR, включающему приведение биологического образца в контакт с описанным в настоящем документе антителом или фрагментом антитела и измерение уровня образования комплекса.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, способ детекции или количественного определения экспрессии PVR включает следующие стадии:

i) инкубирование образца с антителом, специфичным к PVR, или его фрагментом, содержащим по меньшей мере антигенсвязывающую часть;

ii) обнаружение связанного PVR с использованием обнаруживаемого зонда.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, способ дополнительно включает следующие стадии:

iii) сравнение количества (ii) со стандартной кривой, полученной для стандартного образца, содержащего известное количество PVR; и

iv) расчет количества PVR в образце по стандартной кривой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, способ включает определение субъекта, как имеющего PVR-положительный рак, если количество PVR выше, чем контрольный или заданный показатель.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления изобретения, образец представляет собой жидкость организма или твердую ткань. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ осуществляется *in vitro* или *ex-vivo*.

Также предложен набор для измерения экспрессии PVR в биологическом образце, содержащий по меньшей мере одно описанное в настоящем документе антитело или фрагмент антитела и средство для измерения экспрессии PVR. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор дополнительно содержит инструкцию по применению набора.

Дополнительные варианты осуществления и полный объем применимости настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания, приведенного ниже. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают предпочтительные варианты осуществления изобретения, даны только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из подробного описания.

Описание чертежей

Новые признаки, описанные в данном документе, подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание характеристик и преимуществ признаков, описанных в данном документе, будет получено путем обращения к нижеследующему подробному описанию, в котором приведены иллюстративные примеры, в которых используются принципы описанных здесь признаков, и которые сопровождаются следующими чертежами.

Фиг. 1A-1B. Аффинность и конкурентный анализ замен N56.

Фиг. 1A. Улучшенная аффинность связывания PVR вариантами N56E и N56D. Анализ ViaSoge, по-

казывающий относительную и абсолютную аффинность замен N56 (варианты hIgG4) к PVR-HIS (Sino Cat. no. 10109-H08H). Сдвиг аффинности >25% считали значительным. (*) относительные K_{DS} для каждого варианта определяли путем деления K_D замены на K_D исходного варианта N56 (VH0VK0).

На фиг. 1B показано сравнение эффективности химерных антител (5B9 дикого типа (WT) с HC из IgG4 (S241P)) с вариabельными областями, содержащими последовательность CDR2 LC с одиночными аминокислотными заменами (для удаления сайта дезамидирования). Активность измеряли в конкурентном анализе с использованием исходного 5B9. Относительную IC_{50} определяли для каждого варианта путем деления его IC_{50} на IC_{50} химерного антитела дикого типа, тестируемого параллельно.

Фиг. 2A-2B. Улучшенная перекрестная реактивность связывания обезьяньего PVR с вариантами N56E и N56D. Для оценки максимального связывания насыщающую дозу (10 мкг/мл) варианта моноклональных антител N56 (показано на оси X) использовали для окрашивания PVR-экспрессирующих клеток, а средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) определяли с помощью FACS-анализа. Изменение кратности рассчитывали путем деления MFI каждого варианта на MFI исходного антитела (K0). Фиг. 2A. Клетки NCI-H1975 (легкие человека) и фиг. 2B. Клетки Vero (почка африканской зеленой марышки). Сдвиги аффинности >25% считали значительными.

Фиг. 3. Улучшенная активация NK-клеток вариантами N56E и N56T. Чтобы охарактеризовать варианты с заменой N56, проводили анализ индукции CD107a с использованием человеческих NK-клеток от здорового донора и MDA-MB-231 в качестве клеток-мишеней в соотношении 2:1. Антитела добавляли в концентрации 600 пМ. K0 является исходным (родительским) клоном (N56). Все варианты приводили к значительной индукции CD107a (>240% по сравнению с изотипом IgG1). Кроме того, замены N56, такие как N56E и N56T, значительно улучшали индукцию CD107a по сравнению с K0. (* p <0,04, ** p <0,01).

Фиг. 4. Улучшенная пролиферация CD8 T-клеток с помощью вариантов N56E и N56T. Для характеристики вариантов N56 проводили анализ пролиферации T-клеток. Раковые клетки A549 использовали при соотношении эффектор/мишень (E:T) 4:1 в присутствии 2,5 мкл/мл PHA-L и с использованием свежих PBMC человека, меченных CFSE. Все моноклональные антитела варианта N56 (ось X) добавляли в количестве 4 мкг/мл, и совместную культуру инкубировали в течение 96 ч. Представлены результаты FACS-анализа CD8+ T-клеток. Относительную MFI CFSE-метки рассчитывали путем деления MFI группы, обработанной IgG, на MFI каждого варианта. Поскольку увеличение пролиферации приводит к снижению сигнала CFSE, ось Y отображает обратное значение этого отношения. Варианты N56E и N56T значительно увеличивали пролиферацию CD8 T-клеток по сравнению с родительским клоном (K0), помеченным #. (* p <0,05, #<0,04, ** p <0,01).

Фиг. 5A-5B иллюстрируют сродство гуманизованных вариантов к человеческому PVR, измеренное с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (фиг. 5A) или их связывания на поверхности клеток HEK293, экспрессирующих PVR, по данным проточной цитометрии (фиг. 5B). Показаны абсолютные и относительные результаты с использованием химерного мутантного родительского антитела N56E (N56E VH0/Vk0) в качестве точки отсчета.

На фиг. 6A-6B показаны уровни экспрессии (фиг. 6A) и сходство гуманизованных вариантов с последовательностями вариabельного домена зародышевой линии человека (фиг. 6B). Показаны титры отдельных вариантов после транзиторной экспрессии в клетках HEK293 EBNA (фиг. 6A). Показана идентичность последовательности вариabельной области гуманизованных вариантов тяжелой и легкой цепей с последовательностью зародышевой линии человека (фиг. 6B).

На фиг. 7A-7B сравниваются биофизические свойства гуманизованного варианта NB1088 (правый столбец) с гуманизованным вариантом NB941, содержащим последовательность LC CDR2 5B9 WT (левый столбец). На фиг. 7A и фиг. 7B показано снижение образования кислотных соединений в NB1088 с течением времени после стресс-теста при низком pH (фиг. 7A) или при высокой концентрации при 40°C (фиг. 7B).

Фиг. 8A-8D иллюстрируют EC_{50} для связывания NB1088 с PVR (фиг. 8A); IC_{50} для ингибирования связывания PVR-TIGIT с помощью NB1088 (фиг. 8B); IC_{50} для ингибирования связывания PVR-CD96 с помощью NB1088 (фиг. 8C) и IC_{50} для ингибирования связывания PVR-CD226 с помощью NB1088 (фиг. 8D).

На фиг. 9A-9B показано, что NB1088 сам по себе (фиг. 9A и 9B) и в комбинации с ингибированием PD1 пембролизумабом (фиг. 9B) увеличивает высвобождение гамма-интерферона в системе совместного культивирования опухоли/T-клеток с использованием антиген-специфического анализа T-клеток (вирус папилломы человека; HPV) (фиг. 9A) или неспецифического анализа аллогенных T-клеток (фиг. 9B). ** p <0,01 односторонний Anova.

На фиг. 10A-10B показано, что в комбинации с антителом, связывающим рецептор эндотелиального фактора роста (EGFR), NB1088 увеличивает антителозависимую клеточную цитотоксичность в экспрессирующей EGFR линии клеток рака молочной железы A549 (фиг. 10A), и что это совпадает с повышенным высвобождением гамма-интерферона (фиг. 10B), (* p <0,05, ** p <0,01 односторонний Anova).

Фиг. 11A-11B иллюстрируют, что линии опухолевых клеток, экспрессирующие PVR (A549 или CaSki), могут индуцировать подавление CD226, экспрессируемого на CD8 T-клетках (фиг. 11A) и NK-клетках (фиг. 11B), которое может быть восстановлено с помощью NB1088, но не анти-TIGIT (фиг. 11A).

и В). На фиг. 11А показаны результаты, полученные в системе совместного культивирования с использованием анализа антиген-специфических Т-клеток (вирус папилломы человека; HPV) или неспецифического анализа аллогенных Т-клеток.

На фиг. 12А-12В показано NB1088-зависимое увеличение высвобождения гамма-интерферона алло- или антиген-чувствительными CD8⁺ Т-клетками (фиг. 12А), или что NB1088-зависимая индукция НК-клеток, чувствительных к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), в присутствии блокирования EGFR (фиг. 12В) зависит от активности CD226, и в обоих случаях NB1088 проявляет более высокую активность по сравнению с ингибированием TIGIT (концентрация обоих антител 10 мкг/мл).

На фиг. 13А-13Е показано, что NB1088 эффективен в качестве монотерапии на гуманизированной мышинной модели рака поджелудочной железы (фиг. 13А), конкурируя с пембролизумабом (анти-PD-1, вводимым в стандартной дозе, установленной для этих моделей) (фиг. 13В), и на гуманизированной мышинной модели аденокарциномы легкого (фиг. 13С, гуманизированные мыши), и что в этой модели аденокарциномы легкого эффективность зависит от присутствия человеческих иммунных клеток (фиг. 13D, негуманизированные мыши) и коррелирует с повышенной экспрессией CD226 на опухоли, инфильтрирующей CD8⁺ Т-клетки (фиг. 13Е). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, двухфакторный Anova).

Фиг. 14А-14D относятся к модели на фиг. 13С и 13Е, и показывают, что NB1088 увеличивает частоту интерферон-гамма положительных (фиг. 14А) и интерферон-гамма/CD107а двойных положительных (фиг. 14В) CD8 Т-клеток, и что NB1088 увеличивает частоту интерферон-гамма+/CD226+ двойных положительных CD8 Т-клеток (фиг. 14D), но не интерферон-гамма+/CD226- одиночных положительных CD8 Т-клеток (фиг. 14С). * $p = 0,0210$ *** $p < 0,0001$ непарный ТТЕСТ.

Фиг. 15А-15В иллюстрируют фармакокинетику NB1088 (фиг. 15А) и соответствующие фармакодинамические изменения поверхностной экспрессии CD226 (фиг. 15В) на циркулирующих CD4 Т-клетках яванского макака, которые обрабатывали различными дозами антитела однократно (для доз 20 и 50 мг/кг) или 4 раза с интервалом в одну неделю (для дозы 200 мг/кг).

На фиг. 16 показана экспрессия человеческого PVR в биоптатах различных типов рака, измеренная с помощью иммуногистохимии и оцененная по шкале H.

Фиг. 17 представляет собой общее схематическое изображение конструкций CAR-T. Фрагмент scFv включает тяжелые и легкие цепи (VH и VL, соответственно) гуманизированных антител по изобретению.

Фиг. 18 иллюстрирует сильную секрецию интерлейкина 2 (IL2) клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими α PVR CAR-T конструкции, в сравнении с родительскими клетками Jurkat. Родительские клетки Jurkat или клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие α PVR CAR-T конструкции H4K2-NTX1088С или H3K4-NTX1034С (40 тыс. клеток/лунку) инкубировали с клетками A549 или MDA-231 при соотношении E:T 1:1 в течение 24 ч. Секрецию IL2 определяли количественно, используя Biolegend hIL-2 (кат. 431804). Оба драйвера CAR-T увеличивали секрецию IL2 более чем в 100 раз по сравнению с родительскими клетками Jurkat в присутствии указанных мишеней.

Фиг. 19А-19С иллюстрируют повышенное уничтожение клеток-мишеней с помощью анти-PVR (α PVR) CAR-T. Клетки A549 (фиг. 19А) или MDA-231 (фиг. 19В) (по 200 тыс. клеток) помещали в 12-луночный планшет с вариантами CAR-T-PVRNTX-1088С и NTX-1034С в среде NK на 72 часа, при соотношениях E:T 0,4 и 0,8 к 1, соответственно (на основе позитивного GFP). Гибель опухолевых клеток оценивали с использованием стандартного протокола CTG (Promega G9241).

Фиг. 20 иллюстрирует эффективное уничтожение гематологических клеток-мишеней с помощью α PVR CAR-T. Клетки K562 (модель AML) инкубировали с вариантами α PVR CAR-T NTX-1088С и NTX-1034С в RPMI+IL-2 в течение 18 ч при соотношениях E:T, указанных на оси X. Гибель опухолевых клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Значительное уничтожение клеток-мишеней наблюдалось для обоих драйверов CAR-T.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам, которые распознают рецептор полиовируса (PVR). Преимущественно, антитела по изобретению почти полностью гуманизированы, что позволяет избежать риска нежелательного иммунного ответа на антитела, и поэтому они безопасны для применения у людей *in vivo*. Антитела по настоящему изобретению характеризуются уникальной последовательностью CDR, а также новыми гуманизированными последовательностями каркасных участков и дизайном. Более конкретно, моноклональные антитела по настоящему изобретению имеют определенные комбинации CDR и неполностью гуманизованных последовательностей каркасных участков, обладают уникальными свойствами, улучшенной безопасностью и эффективностью по сравнению с известными антителами против PVR.

Некоторые из описанных здесь вариантов обладают повышенной воспроизводимостью и более высокими уровнями экспрессии по сравнению с другими гуманизированными антителами против PVR, содержащими такие же участки CDR. Также в настоящем документе раскрыты способы применения этих антител для лечения рака у индивидуума.

Для обеспечения полного понимания различных вариантов осуществления изобретения в нижеследующем описании изложены некоторые конкретные подробности. Однако специалисту в данной области

техники будет понятно, что приведенные варианты осуществления могут быть реализованы на практике без этих деталей. Если контекст не требует иного, во всем нижеследующем описании и формуле изобретения слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует толковать в открытом, "включающем" смысле, то есть, "включая, но не ограничиваясь". Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Следует также отметить, что термин "или" обычно используется в своем значении, включая "и/или", если из контекста явно не следует иное. Кроме того, приведенные здесь заголовки предназначены только для удобства и не связаны с истолкованием объема или сущности заявленных вариантов осуществления изобретения.

Используемый здесь термин "PVR" относится к рецептору полиовируса, также известному как CD155 (кластер дифференцировки 155), Protein ID: Q92692. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, PVR представляет собой трансмембранный гликопротеин с N-концевой сигнальной последовательностью, тремя внеклеточными иммуноглобулин(Ig)-подобными доменами, трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом. Он имеет молекулярную массу около 80 кДа и структуру, состоящую из трех Ig-подобных доменов, при этом два C2-подобных домена расположены за самым дальним V-подобным доменом. Описанные здесь гуманизированные антитела обладают аффинностью к человеческому PVR (hPVR). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела обладают некоторой аффинностью к белкам PVR других животных, в частности приматов. Предпочтительно, аффинность к другим приматам, таким как африканская зеленая мартышка, делает возможным дальнейшее тестирование гуманизированных антител на безопасность и эффективность в неклинических испытаниях. Не было замечено сродства к PVR более эволюционно далеких животных, таких как грызуны.

Используемый здесь термин "приблизительно" относится к количеству, которое отличается от указанного количества на 10% или менее.

Используемый здесь термин "индивидуум", "пациент" или "субъект" относится к индивидуумам с диагнозом, подозрением на наличие или с риском развития по меньшей мере одного заболевания, для лечения которого применимы описанные композиции и способ. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, индивидуум представляет собой млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, лошадь, корову, овцу, свинью, козу, ламу, альпаку или яка. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

Используемый здесь термин "комбинация" или "комбинированное лечение" может относиться либо к одновременному, либо к последовательному введению препаратов, которые должны находиться в комбинации. Как описано в данном документе, когда комбинация относится к последовательному введению препаратов, препараты можно вводить в любом временном порядке.

Термины "рак" и "опухоль" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, характеризующемуся нарушением регуляции клеточного роста. Рак -это класс заболеваний, при которых группа клеток демонстрирует неконтролируемый или нежелательный рост. Раковые клетки также могут распространяться в другие места, что может привести к образованию метастазов. Распространение раковых клеток в организме может происходить, например, через лимфу или кровь. Неконтролируемый рост, интрузия и образование метастазов также называются злокачественными свойствами рака. Эти злокачественные свойства отличают рак от доброкачественных опухолей, которые обычно не инвазируют и не метастазируют.

Используемый здесь термин "эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, которое вызывает биологический эффект при введении млекопитающему. Биологические эффекты включают, но не ограничиваются следующими: ингибирование или блокада взаимодействия рецептор-лиганд (например, PVR-TIGIT, PD-1-PD-L1/PD-L-2), ингибирование сигнального пути, снижение роста опухоли, уменьшение метастазирования опухоли или увеличение продолжительности жизни животного, имеющего опухоль. "Терапевтическое количество" представляет собой концентрацию лекарственного средства, рассчитанную для получения терапевтического эффекта. Терапевтическое количество охватывает диапазон доз, способных вызывать терапевтический ответ у популяции индивидуумов. Млекопитающее может быть человеком. Человеческий индивидуум может страдать от, подозревать наличие или быть пораженным опухолью.

Используемый здесь термин "ингибитор контрольной точки" относится к лекарственному средству, которое ингибирует биологическую молекулу ("молекулу контрольной точки"), продуцируемую организмом, негативно регулирующую противоопухолевую/противораковую активность Т-клеток в организме. Молекулы контрольной точки включают без ограничения PD-1, PD-L-1, PD-L-2, CTLA4, TIM-3, LAG-3, VISTA, SIGLEC7, PVR, TIGIT, IDO, KIR, A2AR, B7-H3, B7H4, CEACAM1, NOX2, CD112R и CD112.

Предлагаемые антитела могут быть моноклональными антителами, поликлональными антителами, мультиспецифическими антителами (например, биспецифическими антителами и полиактивными антителами) и фрагментами антител.

Антитела включают конъюгаты антител и молекулы, содержащие антитела, такие как химерные

молекулы. Таким образом, антитело включает, но не ограничивается полноразмерным антителом, а также фрагментами и частью антитела, сохраняющими специфичность связывания, такими как любая его специфически связывающая часть, включая антитела, содержащие любое количество таких частей, классы и/или изотипы иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE и IgM); и биологически релевантные (антигенсвязывающие) фрагменты или их специфически связывающие части, включая, но не ограничиваясь следующими: Fab, F(ab')₂, Fv и scFv (одноцепочечный или аналогичный фрагмент). Моноклональное антитело, как правило, представляет собой антитело, находящееся в композиции по существу гомогенных антител; таким образом, любые индивидуальные антитела, содержащиеся в композиции моноклональных антител, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Поликлональное антитело представляет собой препарат, который включает различные антитела с различными последовательностями, которые обычно направлены против двух или более различных детерминант (эпитопов). Моноклональное антитело может содержать человеческую константную область IgG1. Моноклональное антитело может содержать человеческую константную область IgG4.

Термин "антитело" используется здесь в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты, включая участки связывания антигена Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (sFv или scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемные di-scFv, тандемные tri-scFv. Если не указано иное, термин "антитело" следует понимать как включающий функциональные фрагменты антител. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, в том числе IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. Антитело может содержать человеческую константную область IgG1. Антитело может содержать человеческую константную область IgG4.

Термины "участок, определяющий комплементарность" и "CDR", которые являются синонимами "гипервариабельной области" или "HVR", известны в данной области техники и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые отвечают за антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). В данной области техники известно, что "каркасные участки" и "FR" относятся к тем частям переменных областей тяжелой и легкой цепей, которые не являются CDR. Как правило, имеется четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). Точные границы аминокислотной последовательности конкретного участка CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных систем, включая описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации Kabat), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (система нумерации Chothia); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745" (система 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 ("система нумерации IMGT"); Honegger A и Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, ("система нумерации Aho"); и Whitelegg NR и Rees AR, "WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB," Protein Eng. 2000 Dec; 13(12):819-24 (система нумерации "AbM"). В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR описанных здесь антител могут быть определены методом, выбранным из Kabat, Chothia, EVIGT, Aho, AbM или их комбинаций.

Границы данного CDR или FR могут варьироваться в зависимости от системы, используемой для идентификации. Например, нумерация по Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как нумерация по Chothia основана на информации о структуре. Нумерация обеих систем Kabat и Chothia основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител со вставками, которые обозначаются дополнительными буквами, например, "30a", и делециями, появляющимися в некоторых антителах. Эти две системы помещают определенные вставки и делеции ("инсерционно-делеционные мутации") в разные места, что приводит к различиям в нумерации. Система "Contact" основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих аспектах похожа на систему нумерации Chothia.

Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой

цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три участка CDR (см., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., стр. 91 (2007)). Одно домена VH или VL может быть достаточно для наличия антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием VH или VL домена антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных VL или VH доменов, соответственно (см., например, Portolano et al., *J. Immunol* 150:880-887 (1993), Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)).

Предлагаемые антитела включают фрагменты антител. "Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающую антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются следующими: Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv или sFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой фрагменты одноцепочечных антител, содержащие варибельную область тяжелой цепи и/или варибельную область легкой цепи, такие как scFv.

Используемый здесь термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способной вызывать образование антител и специфически связываться с антителом. Антиген может иметь один или более эпитопов. Упомянутое выше специфическое связывание означает, что антиген будет реагировать высокоселективным образом с соответствующим ему антителом, но не с множеством других антител, которые могут быть индуцированы другими антигенами. Антиген в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения представляет собой человеческий PVR.

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь протеолитическим расщеплением интактного антитела, а также продуцированием антител рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой фрагменты, полученные рекомбинантным путем, такие как фрагменты, включающие расположение, которое не встречается в природе; такие как фрагменты с двумя или более областями или цепями антител, соединенными синтетическими линкерами, например, полипептидными линкерами; и/или такие, которые не получают при ферментативном расщеплении природного интактного антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения фрагменты антител представляют собой scFv.

"Гуманизованное" антитело представляет собой антитело, в котором все или практически все аминокислотные остатки CDR получены из CDR нечеловеческого происхождения, а все или практически все аминокислотные остатки FR получены из FR человека. Гуманизованное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, полученную из человеческого антитела. "Гуманизованная форма" нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который подвергся гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности по отношению к человеку, при сохранении специфичности и аффинности родительского нечеловеческого антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, некоторые остатки FR в гуманизованном антителе замещены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности, продуцируемой человеком или клеткой человека, или нечеловеческим источником, в котором используются репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела, включая библиотеки человеческих антител. Термин не включает гуманизованные формы нечеловеческих антител, содержащих нечеловеческие антигенсвязывающие области, такие как антитела, в которых все или практически все CDR являются нечеловеческими.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков, и не ограничены минимальной длиной. Полипептиды, включая предлагаемые антитела и цепи антител, и другие пептиды, например, линкеры и связывающие пептиды, могут включать природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Указанные термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиамирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, модификация полипептида по отношению к его нативной или природной последовательности может осуществляться, пока белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть намеренными, например, как результат сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, как результат мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок из-за амплификации в ходе ПЦР.

Процент (%) идентичности последовательности по отношению к последовательности эталонного полипептида представляет собой процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности эталонного полипептида, получен-

ный после выравнивания последовательностей и, если это необходимо, вставки пропусков для достижения максимального процента идентичности последовательности, при этом любые консервативные замены не рассматриваются, как идентичные. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными известными способами, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего документа значения % идентичности аминокислотной последовательности получены с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Программа сравнения последовательностей ALIGN-2 была создана Genentech, Inc., и исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Ведомство по регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где программа была зарегистрирована под номером регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в открытом доступе, полученном от Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода. Для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую UNIX. V4.0D, программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

В ситуациях, когда для сравнения последовательностей аминокислот используется ALIGN-2, % идентичности аминокислотной последовательности A по отношению к аминокислотной последовательности B (которую можно иначе представить, как заданную аминокислотную последовательность A, которая имеет или содержит определенный процент идентичности аминокислотной последовательности по отношению к, в сравнении с, или против данной аминокислотной последовательности B) рассчитывается следующим образом: $100 \times \frac{X}{Y}$, где X - количество аминокислотных остатков, посчитанных, как идентичные программой выравнивания последовательностей ALIGN-2, в которой осуществляется выравнивание A и B, и где Y - общее количество аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что когда длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичности аминокислотной последовательности A по отношению к B не будет равняться % идентичности аминокислотной последовательности B по отношению к A. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности используемые здесь, получены, как описано в предыдущем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термины "гомологичный", "гомология" или "процент гомологии", когда они используются здесь для описания аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты в сравнении с эталонной последовательностью, могут быть определены с использованием формулы, описанной Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, с изменениями, как в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Такая формула включена в основные программы поиска, основанные на локальном выравнивании (BLAST) Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Процент гомологии последовательностей может быть определен с использованием самой последней версии BLAST на дату подачи настоящей заявки.

Некоторые варианты осуществления изобретения направлены на варианты аминокислотной последовательности антител, предложенных в настоящем документе. Вариант обычно отличается от полипептида, непосредственно описанного в настоящем документе, одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть получены синтетическим путем, например, путем модификации одной или более из указанных выше полипептидных последовательностей по изобретению и оценки одной или более биологических активностей полипептида, как описано в настоящем документе, и/или с использованием любой из известных методик. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеций, вставок и замен может быть использована для получения итоговой конструкции при условии, что итоговая конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связывается с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаются варианты антител, содержащие одну или более аминокислотных замен. Участки, представляющие интерес для мутагенеза путем замены, включают CDR и FR. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело, а продукты подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, сниженную иммуногенность или улучшенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции могут быть сделаны в одном или более CDR, при этом замены, вставки или делеции существенно не снижают связывание антитела с антигеном. Например, в CDR могут быть сделаны консервативные замены, которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут находиться за пределами "горячих

точек" CDR. В некоторых вариантах последовательностей VH и VL ни один из участков CDR не изменен.

Изменения (например, замены) могут быть сделаны в CDR, например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения могут быть сделаны в кодонах, кодирующих CDR, с высокой частотой мутаций во время соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), а полученный вариант можно протестировать на аффинность связывания. Созревание аффинности (например, с использованием подверженной ошибкам ПЦР, перестановки цепей, рандомизации CDR или олигонуклеотид-направленного мутагенеза) можно использовать для улучшения аффинности антител (см., например, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Остатки CDR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования (см., например, Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989)). Чаще всего мишенью становятся CDR-H3 и CDR-L3. Альтернативно или дополнительно, для идентификации точек контакта между антителом и антигеном используется кристаллическая структура комплекса антиген-антитело. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть выбраны в качестве кандидатов для замещения, или исключены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу, чтобы определить, обладают ли они желаемыми свойствами.

Вставки и делеции аминокислотной последовательности включают слияния amino-и/или карбоксильных концов с полипептидами длиной от одного остатка до содержащих сто или более остатков, а также вставки и делеции одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионином. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке. Примеры вариантов вставок внутри последовательности молекул антител включают вставку 3 аминокислот в легкой цепи. Примеры терминальных делеций включают антитело с делецией 7 или менее аминокислот на конце легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения константа диссоциации (K_D) для предложенного в настоящем документе антитела и мишени антитела, человеческого рецептора полиовируса (CD155), имеет приблизительно 1 мкМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,01 нМ или 0,001 нМ или меньше (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). K_D можно измерить любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения K_D можно измерить с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, с использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000).

В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или более аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область антитела, представленного в настоящем документе, с образованием, таким образом, варианта Fc-области. Fc-область здесь представляет собой C-концевой участок тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит по меньшей мере часть константной области. Fc-область включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), включающую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела по данному описанию представляют собой варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает их желательными кандидатами для применений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, тогда как некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не нужны или вредны. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/потери CDC и/или ADCC активности. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) могут быть проведены, чтобы гарантировать, что антитело не связывается с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет ADCC-активности), но сохраняет способность связываться с FcRn. Неограничивающие примеры *in vitro* анализов для оценки ADCC-активности интересующей молекулы описаны в патентах US 5500362 и US 5821337. В качестве альтернативы можно использовать методы нерадиоактивных анализов (например, методы нерадиоактивной цитотоксичности АСТ1™ и CytoTox 96®). Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), моноциты, макрофаги и клетки-натуральные киллеры (NK).

Антитела могут иметь увеличенный период полувыведения и улучшенное связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) (см., например, US 2005/0014934). Такие антитела могут содержать Fc-область с одной или более заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn, и включают антитела с заменами в одном или более остатках Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 в соответствии с системой нумерации EU (см., например, патент US 7371826). Также рассматриваются другие примеры вариантов Fc-области (см., например, Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патенты US 5648260 и US 5624821; и WO 94/29351).

В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть желательно создать антитела со

сконструированным цистеином, например, "тиоMAb", в которых один или более остатков заменены остатками цистеина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, замещенные остатки находятся в доступных участках антитела. Для создания иммуноконъюгата реакционноспособные тиоловые группы могут быть расположены в местах конъюгации с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты лекарственного средства-линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой один или более из следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем документе, может быть дополнительно модифицировано, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, которые известны и доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваются ими. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются следующими: полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливинилового спирта, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливинилового спирта и их смеси. Полиэтиленгликольпропионовый альдегид может иметь преимущества в производстве благодаря его устойчивости в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, а если присоединены два или более полимеров, они могут быть одинаковыми или разными молекулами.

Описанные здесь антитела могут кодироваться нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота представляет собой тип полинуклеотида, состоящего из двух или более нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота является компонентом вектора, который можно использовать для переноса в клетку полинуклеотида, кодирующего полипептид. Используемый здесь термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой интегрированный в геном вектор или "интегрированный вектор", который может быть интегрирован в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора представляет собой "эписомальный" вектор, например нуклеиновую кислоту, способную к внехромосомной репликации. Векторы, способные направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны, называются здесь "векторами экспрессии". Подходящие векторы включают плазмиды, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей, вирусные векторы и т.п. Регуляторные элементы, содержащиеся в векторах экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, предназначенные для регуляции транскрипции, могут быть получены из генов млекопитающих, микробов, вирусов или насекомых. Дополнительно могут быть включены способность реплицироваться в хозяине, обычно обеспечиваемая ориджином репликации, и ген селекции для упрощения 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 хромосому. Векторы могут содержать последовательности, которые направляют сайт-специфическую интеграцию в определенное положение или ограниченный набор участков генома (например, рекомбинация AttP-AttB). Кроме того, векторы могут содержать последовательности, полученные из мобильных генетических элементов.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные здесь антитела, можно использовать для инфицирования, трансфекции, трансформации или иного преобразования подходящей клетки, трансгенной по отношению к нуклеиновой кислоте, что позволяет получать антитела для коммерческого или терапевтического использования. Стандартные клеточные линии и способы получения антител из крупномасштабной клеточной культуры известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка млекопитающего представляет собой клеточную линию, подходящую для получения антител, например, клетку яичников китайского хомячка (CHO), клетку миеломы мыши NS0 или клетку PER.C6®. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, интегрирована в геномный локус клетки, подходящей для получения антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в *in vitro* условиях, достаточных для обеспечения продуцирования и секреции указанного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложен клеточный мастер-банк, содержащий: (а) клеточную линию млекопитающих, содержащую интегрированную в геном нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, описанное в настоящем документе; и (b) криопротектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения криопротектор содержит глицерин. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточный мастер-банк содержит: (а) клеточную линию

СНО, содержащую интегрированную в геном нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело с (i) аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 или 6; и (ii) аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной любой из SEQ ID NO: 2, 7, 8 или 9; и (b) криопротектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения криопротектор содержит глицерин. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточный мастер-банк содержится в подходящем флаконе или контейнере, способном выдерживать замораживание в жидком азоте.

Также в настоящем документе описаны способы получения описанного здесь антитела. Такие способы включают инкубацию клетки или клеточной линии, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в среде для культивирования клеток в условиях, достаточных для экспрессии и секреции антитела, и дальнейшее выделение антитела из среды для культивирования клеток. Выделение 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. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительные стадии очистки включают центрифугирование, ультрацентрифугирование, использование белка А, белка G, белка A/G или белка L и/или ионообменную хроматографию.

Антитела, описанные в настоящем документе

В определенном аспекте в настоящем документе описывается антитело против человеческого PVR (анти-hPVR) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим PVR на границе контакта PVR-TIGIT. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны конкурировать с любым одним или более из TIGIT, CD96 и CD226.

В некоторых вариантах осуществления изобретения EC_{50} гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для связывания с человеческим PVR составляет менее, чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01 нМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения EC_{50} анти-hPVR антитела для связывания с PVR находится в интервале от приблизительно 5 до 1 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 3 нМ, или от приблизительно 3 нМ до приблизительно 2 нМ.

Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) относится к концентрации антитела, которая вызывает ответ, равный половине значения между базовой линией и максимумом, после определенного времени воздействия.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, антитело представляет собой рекомбинантное антитело. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения, антитело представляет собой рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой NB1088 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2).

Один из аспектов, описанный в настоящем документе, относится к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором полиовируса человека (CD155).

В другом аспекте, описанном в настоящем документе, предложено гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь иммуноглобулина, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим рецептором полиовируса (CD155).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложено гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, выбран-

Терапевтические методы

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытых в настоящем документе, представлены анти-hPVR антитела, применимые для лечения рака или опухоли. Лечение относится к способу, направленному на улучшение или облегчение состояния, подлежащего лечению. В отношении рака лечение включает, но не ограничивается следующими: уменьшение объема опухоли, уменьшение роста объема опухоли, увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания или общей продолжительности жизни. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение будет влиять на ремиссию подлежащего лечению рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение включает применение как профилактической или поддерживающей дозы, предназначенной для предотвращения рецидива или прогрессирования ранее леченого рака или опухоли. Специалистам в данной области техники ясно, что не все индивидуумы будут одинаково отвечать или не отвечать на проводимое лечение, тем не менее эти индивидуумы считаются подвергнутыми лечению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, предназначены для применения в производстве лекарственного средства или для применения в способе лечения PVR-положительного рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, предназначены для лечения рака или опухоли, которые не поддаются лечению ингибитором контрольной точки в качестве монотерапии. Рефрактерный рак - это рак/опухоль, при которой развивается прогрессирующее заболевание, несмотря на лечение одним ингибитором контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 (CD279), включая пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб, тислелизумаб (BGB-A317) или их PD-1(CD279)-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой слитый белок PD-L2-Fc (например, AMP-224). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит антитело или PD-L1-связывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1 (CD274). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1 (CD274), включает дурвалумаб (MEDI 4376), атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053, или их PD-L1(CD274)-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит антитело или его связывающий PD-L2 фрагмент, который специфически связывается с PD-L2 (CD273). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит один или более низкомолекулярных ингибиторов, таких как N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиримидин-3-ил)метил]амино}этил]ацетамид (BMS202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидро-бензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (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-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; 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-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; глицинамид; 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-циклический (1 \rightarrow 14)-тиоэфир; или их производное или аналог.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитело или его антигенсвязывающие фрагменты предназначены для применения в комбинации с ингибитором PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 (CD279), включая пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб, тислелизумаб (BGB-A317), или их PD-1(CD279)-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 представляет собой слитый белок PD-L2-Fc (например, AMP-224). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит антитело или PD-L1-связывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1 (CD274). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1 (CD274), включает дурвалумаб (MEDI4376), атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053, или их PD-L1 (CD274)-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит антитело или его PD-L2-связывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L2 (CD273). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит один или более низкомолекулярных ингибиторов, таких как

N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (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-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; 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-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; глицинамид, 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-циклический (1 \rightarrow 14)-гиоэфир; или их производное или аналог.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитело или его антигенсвязывающие фрагменты предназначены для применения в комбинации с ингибитором EGFR или антителом, связывающим EGFR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-hPVR антитела или их антигенсвязывающие фрагменты предназначены для лечения рака или опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак или опухоль представляет собой солидный рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак или опухоль представляет собой гематологический рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак или опухоль включает рак молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы, шеи, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек и/или печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухоли, которые можно лечить антителами по изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкемию, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухоль/рак выбирают из группы, включающей акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, аденокарциному, аденоидно-кистозную карциному, аденому, аденоносаркому, аденосквамозную карциному, астроцитарные опухоли, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, карциному бронхиальной железы, капиллярную карциному, карциному, карциносаркому, холангиокарциному, хондросаркому, цистаденому, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, эпидимальную саркому, саркому Свинга, очаговую узловую гиперплазию, гастроному, опухоли зародышевой линии, глиобластому, глюкогамому, гемангиобластому, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденому печени, аденоматоз печени, гепатоцеллюлярную карциному, инсулит, интраэпителиальную неоплазию, внутриэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, инвазивную плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному, липосаркому, карциному легких, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лейомиосаркому, меланому, злокачественную меланому, злокачественную мезотелиальную опухоль, опухоль оболочки нерва, медуллобластому, медуллоэпителиому, мезотелиому, мукоэпидермоидную карциному, миелоидный лейкоз, нейробластому, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, остеосаркому, рак яичников, папиллярную серозную аденокарциному, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, бластную карциному простаты, почечно-клеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, эпидермоидный рак, недифференцированную карциному, увеальную меланому, веррукозный рак, рак влагалища/вульвы, ВИПому и опухоль Вильмса. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухоль/рак, подлежащие лечению одним или более антителами по изобретению, включают рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, острый пре-B-клеточный лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV степени, глиобластому, мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы и рак молочной железы, предпочтительно рак протоков молочной железы и/или карциному молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат антителами по настоящему изобретению, включает глиобластому. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат одним или более антителами по настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат одним или более антителами по настоящему изобретению, включает рак яичников. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат одним или более антителами по настоящему изобретению, включает рак легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак,

который лечат одним или более антителами по настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат одним или более антителами по настоящему изобретению, включает рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат, включает глиобластома, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легких. В определенном варианте осуществления изобретения рак не поддается другому лечению. В определенном варианте осуществления изобретения рак, подвергающийся лечению, является рецидивирующим. В определенном варианте осуществления изобретения рак представляет собой рецидивирующую/рефрактерную глиобластома, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легких.

Для специалистов в данной области будет очевидно, что терапевтически эффективное количество молекулы по настоящему изобретению будет зависеть, среди прочего, от схемы введения, стандартной дозы вводимой молекулы, от того, вводится ли молекула в комбинации с другими терапевтическими агентами, иммунного статуса и здоровья пациента, терапевтической активности вводимой молекулы, ее устойчивости в кровообращении и мнения лечащего врача.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела можно вводить нуждающемуся в этом субъекту любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, например, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутриопухолевым или внутримозговым и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела вводят внутриопухолевым путем. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела вводят по подходящей схеме дозирования, например, еженедельно, два раза в неделю, ежемесячно, два раза в месяц, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз в месяц и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела вводят один раз в три недели. Антитела могут вводиться в любом терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически приемлемое количество находится в интервале от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически приемлемое количество находится в интервале от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически приемлемое количество находится в интервале от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Терапевтически эффективные количества включают количества, достаточные для облегчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием или недугом, подлежащим лечению.

Антитела по настоящему изобретению можно применять в основанной на CAR адаптивной иммунотерапии, в которой для лечения рака используются сконструированные лимфоциты, содержащие CAR. Система CAR-T описана здесь в качестве неограничивающего примера.

В Т-клеточной терапии для лечения рака или опухолей используют химерный антигенный рецептор (CAR) (CAR-T-клеточная терапия). CAR-T-клеточная терапия это клеточная иммунотерапия, которая включает введение раковому пациенту генетически модифицированных Т-клеток, которые воздействуют на опухолевые клетки и вызывают апоптоз опухолевых клеток. Генетически сконструированные Т-клетки получают путем экспрессии в Т-клетке CAR, содержащего вариативные области антитела (VL и VH) в сочетании с внутриклеточным доменом, таким как фрагмент последовательности CD3 ζ -цепи, с использованием метода переноса генов. CAR - это общий термин для химерного белка, в котором вариативные области легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела, специфичного к опухолевому антигену, связаны друг с другом и затем соединены с цепью Т-клеточного рецептора (TCR) со стороны С-конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит по меньшей мере один белковый домен, выбранный из группы, состоящей из CD8-домена Stalk-домена, CD28 TM-домена, 41BB-домена и CD3 ζ -домена. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит CD8 Stalk-домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит CD28 TM-домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит сигнальный домен CD3 ζ . Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит 41BB-домен. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит CD8 Stalk-домен, CD28 TM-домен, 41BB-домен и CD3 ζ -домен.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий вариативную область тяжелой цепи (VH) и вариативную область легкой цепи (VL) по изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, предложен генетически модифицированный лимфоцит, на поверхности которого экспрессируется CAR. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, предложена генетически модифицированная Т-клетка, на поверхности которой экспрессируется CAR (CAR-T-клетка).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит комбинацию вариативных областей тяжелой и легкой цепей, причем вариативная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 92, 94, 96 или 98% идентична последо-

вательности выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 92, 94, 96 или 98% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепи гуманизованного антитела, где комбинация выбрана из группы, состоящей из:

- i) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;
- ii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 3, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;
- iii) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9;
- iv) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9; и
- v) последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6, и последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 6, и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 9, трансмембранный домен и внутриклеточный Т-клеточный сигнальный домен.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, CAR содержит последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57, или ее аналог, последовательность которого по меньшей мере на 90, 92, 94, 96 или 98% сходна с любой из указанных последовательностей. В соответствии с определенным аспектом настоящее изобретение относится к клетке, содержащей описанный здесь CAR. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, клетка экспрессирует или способна экспрессировать CAR по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, клетка представляет собой лимфоцит. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, клетка выбрана из Т-клетки и клетки натурального киллера (NK).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, предложен лимфоцит, сконструированный для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, предложена Т-клетка, сконструированная для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления изобретения, предложена NK-клетка, сконструированная для экспрессии CAR, описанного в настоящем документе.

Настоящее изобретение также раскрывает способы диагностики и прогнозирования рака.

В соответствии с одним из аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики и/или прогнозирования рака или инфекционного заболевания у субъекта, включающему стадию определения уровня экспрессии PVR в биологическом образце указанного субъекта с использованием по меньшей мере одного описанного здесь антитела.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, носители и разбавители

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-PVR антитела согласно настоящему описанию включены в фармацевтическую композицию, содержащую один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, носителей и разбавителей. Носитель (носители) должен быть фармацевтически приемлемым в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами композиции и не оказывать чрезмерно вредного воздействия на реципиента. Активный агент предоставляется в количестве, эффективном для достижения желаемого фармакологического эффекта, как описано выше, и в количестве, подходящем для достижения желаемого воздействия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, согласно настоящему описанию, вводятся в виде суспензии в стерильном растворе. В некоторых вариантах осуществления изобретения раствор содержит около 0,9% NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения раствор содержит около 5,0% декстрозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения раствор дополнительно содержит один или более буферов, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометановый (трис); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 20 (Tween 20) и полоксамер 188; полиол/дисахарид/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин; или

хелатирующие агенты, например, EDTA или EGTA.

Как правило, антитела, их фрагменты и конъюгаты по настоящему изобретению, содержащие антигенсвязывающую часть антитела или содержащие другой полипептид, включая пептидомиметик, суспендируют в стерильном солевом растворе для терапевтического применения. Альтернативно, могут быть составлены фармацевтические композиции, обеспечивающие контролируемое высвобождение активного ингредиента (молекулы, содержащей антигенсвязывающую часть антитела) или пролонгирование его присутствия в организме пациента. Известны многочисленные подходящие системы доставки лекарств, которые включают, например, имплантируемые системы высвобождения лекарств, гидрогели, гидроксиметилцеллюлозу, микрокапсулы, липосомы, микроэмульсии, микросферы и т.п. Препараты с контролируемым высвобождением могут быть приготовлены с использованием полимеров для комплексообразования или адсорбции молекулы согласно настоящему изобретению. Например, биосовместимые полимеры включают матрицы из сополимера этилен-винилацетат и матрицы из полиангидридного сополимера димера стеариновой кислоты и себариновой кислоты. Скорость высвобождения из такой матрицы молекулы по настоящему изобретению, т.е. антитела или фрагмента антитела, зависит от молекулярной массы молекулы, количества молекулы в матрице и размера диспергированных частиц.

В некоторых вариантах осуществления осуществления антитела, согласно настоящему описанию, доставляются/хранятся в лиофилизированном виде и восстанавливаются перед введением. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиофилизированные составы антител содержат наполнитель, такой как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза, декстран 40 или их комбинации. Лиофилизированный состав может содержаться во флаконе из стекла или другого подходящего нереакционноспособного материала. Антитела в готовом виде, независимо от того, восстановлены они или нет, могут быть забуферены при определенном pH, обычно менее 7,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH может составлять от 4,5 до 6,5, от 4,5 до 6,0, от 4,5 до 5,5, от 4,5 до 5,0 или от 5,0 до 6,0.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лимфоциты, несущие описанный здесь CAR, транспортируются/хранятся перед использованием. Клетки обычно криоконсервируют, если они не используются сразу же. Способы криоконсервации и среды для хранения, подходящие для клеток, несущих CAR, известны в данной области, см., например, Wang, et al. 2019 May;21(5):566-578. Также в настоящем документе описаны наборы, содержащие одно или более описанных в настоящем документе антител в подходящем контейнере и один или более дополнительных компонентов, выбранных из: инструкции по применению; разбавителя, наполнителя, носителя и устройства для введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор содержит средства для измерения экспрессии человеческого PVR.

Некоторые варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, относятся к способу приготовления средства для лечения рака, включающему смешивание одного или более фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей или разбавителей и антитела согласно настоящему описанию. Некоторые варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, относятся к способу подготовки средства для лечения рака к хранению или транспортировке, включающему лиофилизацию одного или более антител согласно настоящему описанию.

Примеры

Следующие иллюстративные примеры представляют варианты осуществления композиций и способов, описанных в настоящем документе, и не должны рассматриваться, как каким-либо образом ограничивающие.

Пример 1. Улучшенная аффинность связывания PVR вариантами N56E и N56D.

Варибельная область химерного анти-PVR антитела 5B9, раскрытого в WO 2017149538, включает последовательность дезамидирования (аспарагин-глицин) в CDR2 легкой цепи (WASSRHNG, SEQ ID NO: 17). Семь химерных вариантов были получены путем введения точечной мутации в положение остатка аспарагина N56. Для оценки аффинности связывания вариантов с заменой N56 моноклональные антитела дикого типа (WT) и варианты с заменами IgG4 (S241P) иммобилизовали на захватывающем чипе белка А. Связывание тестировали для анализа PVR, конъюгированного с гистидиновой меткой (PVR-HIS, Sino Cat. No. 10109-H08H). Диапазон разведения: пять точек с двукратным разведением от 50 нМ до 3,125 нМ. Используемые условия: Инструмент: Biacore T200 (серийный номер 1909913) с программным обеспечением Biacore T200 Evaluation Software V2.0.1. Рабочий буфер: HBS-P+, 300 мМ NaCl, 1 мг/мл BSA. Скорость потока: 30 мкл /мин. Ассоциация: 350 с, диссоциация: 800 с. Восстановление: 10 мМ глицин, pH 1,5. Анализ: связывание 1:1. Относительную K_D для каждого варианта с заменой устанавливали путем деления K_D варианта с заменой на K_D родительского варианта N56 (VH0VK0). Значительное (>25%) улучшение аффинности было отмечено для вариантов N56E (Asp) и N56D (Glu) (фиг. 1A). Связывание химерных вариантов с человеческим PVR, экспрессированным на клетках HEK293 EBNA, оценивали с помощью проточной цитометрии в конкурентном анализе с использованием родительского антитела 5B9 (WT, фиг. 1B).

Пример 2. Улучшенная перекрестная реактивность в отношении связывания обезьяньего PVR с вариантами N56E и N56D.

Исследовали связывание вариантов антител с заменой N56 с клетками, связывающими PVR человека (protein id: Q92692Q92692) и хлороцебуса (африканская зеленая мартышка, protein id: UniProtKB -

P32506). На фиг. 2А показано относительное связывание всех вариантов, добавленных в насыщающей концентрации (10 мкг/мл), к клеткам NCI-H1975, экспрессирующим человеческий PVR. На фиг. 2В показано относительное связывание всех вариантов, добавленных в насыщающей концентрации (10 мкг/мл) к клеткам Vero, экспрессирующим PVR хлороцебуса. Для детекции использовали козье анти-человеческое антитело 647 (иммунологическое исследование Джексона 109-606-088) в разведении 1:250. Связывание клеток с антителами анализировали с помощью FACS. Изменение кратности рассчитывали путем деления MFI каждого варианта на MFI родительского антитела (K0). Значительное (>25%) увеличение перекрестной реактивности наблюдали для вариантов N56E и N56D.

Пример 3. Улучшение активации NK-клеток вариантами N56E и N56T.

NK-клетки от здоровых доноров инкубировали в присутствии выбранных вариантов с заменой N56 и целевой клеточной линии рака молочной железы (MDA-MB-231) при соотношении E:T (эффектор : мишень) 2:1 в течение 2 ч при 37°C. Активацию NK-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD107a, и для каждого варианта рассчитывали кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Все моноклональные антитела использовали в концентрации 600 пМ (0,09 мкг/мл). (*p<0,04, **p<0,01 по двустороннему t-критерию Стьюдента). Как показано на фиг. 3, варианты N56E и N56T показали улучшенную активацию NK-клеток по сравнению с K0, о чем свидетельствует повышенная экспрессия CD107a.

Пример 4. Улучшенная пролиферация CD8 T-клеток с помощью вариантов N56E и N56T.

Человеческие PBMC метили флуоресцентной меткой CFSE (C34554 ThermoFischer) и инкубировали с целевыми клетками рака молочной железы A549 в присутствии 2,5 мкл/мл PHA-L (Roche) и указанными вариантами антител в концентрации 4 мкг/мл. После инкубации в течение 96 часов иммунные клетки собирали, окрашивали анти-человеческим CD8 и анализировали с помощью FACS. Клеточную пролиферацию CD8+ T-клеток оценивали по интенсивности сигнала CFSE. Уровни CFSE для клеток, обработанных IgG, принимали за 1. Результаты представляли как кратное увеличение пролиферации по сравнению с этим контролем. Поскольку увеличение пролиферации приводит к снижению сигнала CFSE, ось Y отображает обратное значение этого соотношения. Эксперименты проводились в четырех повторах. Показаны результаты для одного донора PBMC. Полученные данные позволяют предположить, что варианты N56E и N56T оказывают значительно более сильное влияние на пролиферацию CD8+ T-клеток в присутствии опухолевых клеток по сравнению с родительским антителом (фиг. 4; *p<0,05, **p<0,01 по двустороннему t-критерию Стьюдента).

Пример 5. Идентификация гуманизованного варианта 5B9 с улучшенной воспроизводимостью.

Вариант антитела N56E показал наилучшие результаты в конкурентном анализе и был выбран в качестве основного варианта для гуманизации. На основе структурного анализа был идентифицирован большой предварительный набор сегментов последовательности, которые использовались для создания гуманизованных вариантов 5B9. Эти сегменты были отобраны и проанализированы с использованием технологии iTope™ для in silico анализа связывания пептидов с аллелями человеческого MHC класса II (Perry et al. 2008) и с использованием базы TCED™ (T cell epitope database) известных T-клеточных эпитопов, относящихся к последовательностям антител (Bryson et al 2010). Сегменты последовательности, которые были идентифицированы, как фрагменты нечеловеческой зародышевой линии, связывающиеся с человеческим MHC класса II, или те, что показали значительное совпадение с базой TCED™, были отброшены. Это привело к уменьшению набора сегментов, и их комбинации были дополнительно проанализированы как описано выше, чтобы убедиться, что соединения сегментов не образуют потенциальных T-клеточных эпитопов. Выбранные последовательности сегментов были собраны в полные последовательности V-областей, которые были лишены значимых T-клеточных эпитопов. Затем были выбраны пять последовательностей тяжелых цепей (от VH1 до VH5) и 4 последовательности легких цепей (содержащих замену N56E) (от Vk1 до Vk4).

Таблица 1

Вариабельные области и последовательности CDR

SEQ ID NO:	Последовательность	Цепь
1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSKATGYTFSNYWIEWVR QAPGGLEWIGEIFPGSGRINFNEKFKGRVFTADTSISTT YMELSRRLRSDDTAVYYCARTKIYGNSFDYWGQGLVTVS S	VH4

2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTA VVWYQQK PGKAPKLLIYWASSRHEGVDRFSGSGSGTDFLT ISSLQP EDFADYFCQQYSRYPLTFGQGTKLEIK	VK2
3	QVQLVQSGAELKKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWIKQ APGQGLEWIGEIFPGSGRINFNEKFKGR ATFTADTSIDTTYMQLSSLTSDDSAVYYCARTKIYGN SFD YWGQGTITVTVSS	VH1
4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWIKQ APGQGLEWIGEIFPGSGRINFNEKFKGRATFTADTSIDTY MELSR LRSDDTAVYYCARTKIYGN SFDYWGQGT LTVSS	VH2
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKATGYTFSNYWIEWIKQ APGQGLEWIGEIFPGSGRINFNEKFKGRVFTADTSISTTY MELSR LRSDDTAVYYCARTKIYGN SFDYWGQGT LTVSS	VH3
6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKATGYTFSNYWIEWVR QAPGQGLEWMGEIFPGSGRINFNEKFKGRVFTADTSIST AYMELSR LRSDDTAVYYCARTKIYGN SFDYWGQGT LVT VSS	VH5
7	DIMMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTA VVWYQQK PGKAPKLLIYWASSRHEGVDRFTGSGSGTDFLT ISSLQS EDFADYFCQQYSRYPLTFGQGTKLEIK	VK1
8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGTA VVWYQQK PGKAPKLLIYWASSRHEGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQP EDFATYFCQQYSRYPLTFGQGTKLEIK	VK3
9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGTA VAWYQQK PGKAPKSLIYWASSRHEGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQP EDFATYFCQQYSRYPLTFGQGTKLEIK	VK4
10	NYWIE	HCCDR1
11	EIFPGSGRINFNEKFKG	HCCDR2
12	TKIYGN SFDY	HCCDR3
13	$X_1ASQDVGTA VX_2$ $X_1=K$ или R , $X_2 =V/A$	LCCDR1
14	WASSRHE	LCCDR2
15	QQYSRYPLT	LCCDR3
16	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWIKQ RPGHGLEWIGEIFPGSGRINFNEKFKGKATFTADTSSDTTY MQLSSLT SADS AVYYCARTKIYGN SFDYWGQGT LTVSP	VH0 5B9
17	DIMMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVGTA VVWYQQ KPGQSPKLLIYWASSRHNGVDRFTGSGSGTDFLT ISNV QSELDSDYFCQQYSRYPLTFGAGTKLELK	VK0 5B9

Таблица 2
Последовательности каркасных участков (не CDR) гуманизированных варибельных областей тяжелой цепи

Цепь	FR-H1	FR-H2	FR-H3	FR-H4
VH 4	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KATGYTFS (SEQ ID NO: 18)	WVRQAPGQGLE WIG (SEQ ID NO: 19)	RVTFTADTSIST YMELSLRSDDT AVYYCAR (SEQ ID NO: 20)	WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 21)
VH 1	QVQLVQSGAEL KKPGASVKISCK ATGYTFS (SEQ ID NO: 22)	WIKQAPGQGLE WIG (SEQ ID NO: 23)	RATFTADTSIDT TYMQLSSLTSD SAVYYCAR (SEQ ID NO: 24)	WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
VH 2	QVQLVQSGAEV KKPGASVKISCK ATGYTFS (SEQ ID NO: 26)	WIKQAPGQGLE WIG (SEQ ID NO: 23)	RATFTADTSIDT TYMELSLRSDD TAVYYCAR (SEQ ID NO: 27)	WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 21)
VH 3	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KATGYTFS (SEQ ID NO: 18)	WIKQAPGQGLE WIG (SEQ ID NO: 23)	RVTFTADTSIST YMELSLRSDDT AVYYCAR (SEQ ID NO: 20)	WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 21)
VH 5	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KATGYTFS (SEQ ID NO: 18)	WVRQAPGQGLE WMG (SEQ ID NO: 28)	RVTFTADTSIST AYMELSLRSD DTAVYYCAR (SEQ ID NO: 29)	WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 21)

Таблица 3
Последовательности каркасных участков (не CDR) гуманизированных варибельных областей легкой цепи

Цепь	FR-L1	FR-L2	FR-L3	FR-L4
VK 2	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVITC (SEQ ID NO: 30)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO: 31)	GVPDRFSGSGSG TDFLTISLQPE DFADYFC (SEQ ID NO: 32)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)
VK 1	DIMMTQSPSFLS ASVGDRVITC (SEQ ID NO: 34)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO: 31)	GVPDRFTGSGSG TDFLTISLQSE DFADYFC (SEQ ID NO: 35)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)
VK 3	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVITC (SEQ ID NO: 30)	WYQQKPGKAPK LLIY (SEQ ID NO: 31)	GVPSRFSGSGSG TDFLTISLQPE DFADYFC (SEQ ID NO: 36)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)
VK 4	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVITC (SEQ ID NO: 30)	WYQQKPGKAPK SLIY (SEQ ID NO: 37)	GVPSRFSGSGSG TDFLTISLQPE DFADYFC (SEQ ID NO: 36)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)

Все варианты тестировали на связывание с помощью SPR (фиг. 5A), а варианты с аффинностью в два раза отличающейся от родительского антитела тестировали на связывание с PVR клеточной поверхности с использованием проточной цитометрии (фиг. 5B). За исключением вариантов, содержащих Vк4, все варианты показали уровни связывания, близкие к родительской химерной (мышь/человек) молекуле, содержащей замену N56E (IgG4 (S241P) N56E_VHO/VKO). Отмечалось, что гуманизация привела к удалению участка N-гликозилирования в положении N20 области FR1 легкой цепи.

Для выбора лидерного кандидата учитывали уровни экспрессии после транзientной экспрессии в клетках HEK293 EBNA и сходство с последовательностью зародышевой линии человека (фиг. 6). На фиг. 6A суммированы титры всех вариантов после транзientной трансфекции. Вариант VH4/Vк2 показал са-

мые высокие титры экспрессии и обладает высоким процентом идентичности последовательностей с генами зародышевой линии человека (фиг. 6B). Наконец, оценку воспроизводимости варианта VH4/Vk2 (NB1088) проводили в сравнении с вариантом, идентичным NB1088, но с исходным деамилирующим компетентным LC CDR2 из 5B9 (WASSRHNG), обозначенным как NB0941. Были определены биофизические свойства NB0941 и NB1088. Как показано на фиг. 7A и 7B, стресс, связанный с высоким pH, и инкубация при 40°C выявили изменения в капиллярном изоэлектрическом фокусировании (сIEF), в частности, увеличение процентного содержания кислотных соединений, возможно, из-за деамилирования. Эти изменения были более выражены в NB0941 по сравнению с NB1088. Поэтому NB1088 с оптимизированным профилем иммуногенности, экспрессии и связывания, а также желаемыми биофизическими свойствами был выбран в качестве лидерного гуманизованного варианта для функционального анализа.

Снижение аффинности, наблюдаемое в некоторых вариантах, особенно полезно при разработке CAR-драйвера, учитывая тот факт, что нормальные ткани экспрессируют минимальные уровни PVR. Результаты (фиг. 16) показывают, что PVR сверхэкспрессируется в различных опухолях, что позволяет эффективно нацеливать на эти опухоли CAR-T, управляемый PVR. Потенциальная проблема безопасности может быть легко решена с помощью анти-PVR вариантов со сниженной ("настроенной") аффинностью, как описано в публикации Liu et al. (Cancer research, 2015; Volume 75, Issue 17).

Пример 6. NB1088 ингибирует связывание PVR с TIGIT, CD96 и CD226.

NB1088 тестировали на его способность блокировать связывание TIGIT, CD96 и CD226 с PVR. Диссоциированные клетки CHO (яичники китайского хомячка), стабильно экспрессирующие человеческий PVR, инкубировали с NB1088 в указанных концентрациях в течение 20 мин на льду с последующим добавлением 10 мкг/мл биотинилированного рекомбинантного TIGIT, CD96 или CD226-Fc, соответственно, и выдерживали на льду еще 120 мин. После промывания поверхно-связанный NB1088 определяли с помощью вторичного антитела, конъюгированного с анти-человеческим Alexa-488, а биотинилированные белки определяли с помощью конъюгированного с Alexa647 стрептавидина, и анализировали с использованием проточной цитометрии. На фиг. 8A показано, что NB1088 связывается с PVR с EC₅₀ около 3,3 наномоль. IC₅₀ для NB1088 для конкуренции с TIGIT, CD96 или CD226 за связывание с PVR составляет 1,1, 1,1 и 1,9 нМ, соответственно, как показано на фиг. 8B-8D.

Пример 7. NB1088 стимулирует цитотоксические T- и NK-клетки.

Определяли способность NB1088 стимулировать активность T- и NK-клеток *in vitro*. Используя методику на основе антиген-специфического вируса папилломы человека (HPV), 30000 клеток HPV+ клеточной линии эпидермоидной карциномы шейки матки человека (клетки CaSki) и 30000 HPV-специфических CD8 T-клеток совместно инкубировали с контрольным IgG или NB1088 в концентрации 10 мкг/мл в течение ночи. Высвобождение гамма-интерферона в супернатант определяли с помощью системы MSD, специфичной для гамма-интерферона человека. Как показано на фиг. 9A, NB1088 увеличивал высвобождение гамма-интерферона из человеческих HPV-специфических CD8+ (цитотоксических) T-клеток при инкубации с HPV+ клетками CaSki. Чтобы протестировать активность CD8 T-клеток в аллогенной системе, PBMC предварительно активировали в течение трех дней фитогемагглютинином (PHA) и интерлейкином 2 (IL2), выдерживали в течение ночи в отсутствие PHA/IL2 перед выделением CD8 T-клеток с использованием методики негативного выделения с помощью магнитной сепарации. 10000 опухолевых клеток A549 и 100000 здоровых донорских CD8+ T-клеток совместно культивировали в течение ночи в присутствии 100 ЕД/мл IL2 и 1 мкг/мл анти-CD28-антитела. Как показано на фиг. 9B, NB1088 увеличивал высвобождение гамма-интерферона из CD8+ T-клеток в большей степени, чем антитело против PD-1 (пембролизумаб), и оно дополнительно повышалось в результате комбинации NB1088 и антитела против PD-1.

Также определяли влияние NB1088 на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). NK-клетки от здоровых доноров выделяли из PBMC, оставленных на ночь, с использованием методики негативного выделения с помощью магнитной сепарации. 10000 PVR+ и EGFR+ опухолевых клеток A549 и 50000 NK-клеток инкубировали или с контрольным IgG; или с контрольным IgG и анти-EGFR антителом цетуксимаб (5 мкг/мл), или с цетуксимабос и NB1088. Активность NK-клеток в отношении антителозависимой клеточной цитотоксичности или высвобождения гамма-интерферона определяли с помощью Cell Titer Glow путем анализа жизнеспособности прикрепленных клеток A549 после совместного культивирования и удаления NK-клеток или с помощью MSD анализа супернатантов, как указано выше. Как показано на фиг. 10A и 10B, при инкубации с цетуксимабом NB1088 был способен увеличивать опосредованное NK-клетками уничтожение клеток A549, а также высвобождение гамма-интерферона.

Пример 8. NB1088 восстанавливает экспрессию и активность CD226 в CD8 T- и NK-клетках.

Определяли способность NB1088 влиять на функцию CD226. CD226 (DNAM-1) представляет собой гликопротеиновый рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый NK- и T-клетками, который служит лигандом для PVR и способствует уничтожению опухоли CD8+ T- и NK-клетками. По своей функции ему противостоят TIGIT и CD96, представляющие собой ингибирующие молекулы, экспрессируемые на T- и NK-клетках. Таким образом, усиление функции CD226 из-за NB1088 указывает на то, что

NB1088 будет усиливать активность Т- и НК-клеток и обладать широким спектром противоопухолевой активности. Влияние NB1088 на экспрессию и функцию CD226 тестировали в антигенспецифических и аллогенных системах совместного культивирования, как описано выше. Как показано на фиг. 11А и 11В, совместное культивирование CD8 Т-клеток и НК-клеток с PVR+ клетками-мишенями приводило к сильному снижению поверхностной экспрессии CD226 на CD8 Т-клетках и НК-клетках. NB1088 восстанавливал экспрессию CD226 на клеточной поверхности CD8 Т-клеток или НК-клеток, независимо от системы совместного культивирования (фиг. 11А и В), в отличие от анти-TIGIT. Функциональные последствия повышения экспрессии CD226 на Т- и НК-клетках после обработки NB1088 оценивали с использованием описанных выше антигенспецифических и аллогенных систем совместного культивирования с небольшими модификациями (фиг. 12А и В). Повышенная экспрессия CD226 коррелировала со значительно более высокими уровнями высвобождения гамма-интерферона после обработки NB1088 по сравнению с обработкой контрольным IgG или анти-TIGIT (фиг. 12А и В). Превосходная активность Т- и НК-клеток при обработке NB1088 была, по крайней мере, частично опосредована активностью CD226. Анти-CD226 (DX11, 20 мкг/мл) снижало NB1088-зависимое высвобождение гамма-интерферона как алло-, так и антиген-стимулированными CD8 Т-клетками (фиг. 12А) и НК-клетками после совместного культивирования с А549 (фиг. 12В) до уровней, наблюдаемых с анти-TIGIT. Эти данные демонстрируют, что NB1088 улучшает активность Т- и НК-клеток по сравнению с блокадой TIGIT за счет увеличения экспрессии и/или функции CD226.

Пример 9. Эффективность монотерапии NB1088 в гуманизированных мышинных моделях ксенотрансплантатов опухоли.

Определяли способность NB1088 уничтожать опухоли А549 (аденокарциномы легкого) или НРАФ (поджелудочной железы) на модели гуманизированных мышей. Вкратце, 5×10^6 опухолевых клеток (А549 или НРАФ) смешивали в матригеле с человеческими активированными мононуклеарными клетками периферической крови в соотношении 1:1 и подкожно имплантировали в бок иммунодефицитным мышам NOD/SCID (12 животных на состояние). Как показано на фиг. 13А и 13В, NB1088 был способен уменьшать объем опухоли, по меньшей мере так же, как анти-PD-1 антитело пембролизумаб. NB1088 также был способен сокращать объем опухоли в модели А549/РВМС (фиг. 13С), но не тогда, когда использовались только клетки А549 (фиг. 13D). В модели А549/РВМС уменьшение объема опухоли коррелировало с повышенной экспрессией CD226 на CD8 Т-клетках, выделенных из опухолей, обработанных NB1088 (фиг. 13Е). Также оценивали влияние NB1088 на эффекторную функцию CD8 Т-клеток *ex vivo* (фиг. 14А и В). Суспензии лизированных одиночных клеток из опухолей стимулировали анти-CD28/анти-CD3 в присутствии брэфельдина А и анти-CD107а в течение 5 ч при 37°C. После стимуляции клетки окрашивали с использованием стандартных методик поверхностного/внутриклеточного окрашивания, чтобы с использованием проточной цитометрии оценить продуцирование гамма-интерферона CD8+ Т-клетками. Как показано на фиг. 14А и 14В, NB1088 увеличивал частоту общих гамма-интерферон положительных (фиг. 14А) и полифункциональных гамма-интерферон/CD107а двойных положительных (фиг. 14В) CD8 Т-клеток, полученных из опухолей. Кроме того, повышенная частота гамма-интерферон положительных CD8+ Т-клеток в опухолях, обработанных NB1088, была получена исключительно из CD226-положительных CD8+ Т-клеток (фиг. 14С и 14D), что свидетельствует о важном вкладе функции CD226 *in vivo* в противоопухолевую активность NB1088.

Пример 10. Фармакокинетика NB1088 и фармакодинамические изменения экспрессии CD226 на CD4 Т-клетках яванского макака.

Фармакокинетические свойства NB1088 измеряли после однократной или 4x1 еженедельной внутривенной болюсной инъекции в дозах 2, 50 или 200 мг/кг на яванских макаках (2 самки обезьян на каждую дозу). Кроме того, оценивали изменения экспрессии CD226 на циркулирующих периферических CD4 Т-клетках. На фиг. 15А показаны концентрации⁴ NB1088 в плазме (мкг/мл), как функция времени (в часах) и дозы. IC₉₀ и 10x IC₉₀ рассчитывали на основе *in vitro* анализов активности с использованием анализа РВМС яванских макаков. NB1088 показало типичный фармакокинетический профиль и достигало концентраций выше 10x IC₉₀ на протяжении всего исследования после повторной дозы 200 мг/кг. На фиг. 15В показаны уровни экспрессии CD226 на циркулирующих CD4 Т-клетках, нормализованные до дозы перед введением, измеренные с помощью проточной цитометрии со специфическими антителами. NB1088 повышал уровни поверхностной экспрессии CD226 до 1,5 раз в группе, получавшей дозу 50 мг/кг, и в группе повторной дозы 200 мг/кг, и оставался повышенным в группе повторной дозы 200 мг/кг. Эти данные показывают, что NB1088 может запускать и модулировать экспрессию CD226 на CD4 Т-клетках яванского макака.

Пример 11. Экспрессия человеческого PVR в разных типах опухолей.

Оценивали уровни экспрессии PVR для человеческих раков различного происхождения. Экспрессию PVR определяли стандартными методами иммуногистохимии с использованием коммерчески доступного клона кроличьего моноклонального антитела D3G7H и микрочипов раковой ткани. Окрашивание оцифровывали и количественно определяли интенсивность для расчета H-показателей в процессе и между опытами. На фиг. 16 показаны повышенные уровни экспрессии PVR при большинстве раков, про-

анализированных в разных повторностях. Повышенная экспрессия PVR была показана при раке печени, раке толстой кишки, раке надпочечников, раке матки, раке яичек, плоскоклеточном раке легкого, раке желудка, раке пищевода, раке яичников, раке мочевого пузыря, раке предстательной железы, холангиокарциноме, раке кожи, HNSCC раке, раке молочной железы, раке поджелудочной железы, немелкоклеточном раке легкого и меланоме. Эти данные свидетельствуют о вкладе PVR в прогрессирование опухоли при различных типах рака человека.

Пример 12. Конструирование гуманизованного антитела.

Гуманизованные IgG антитела были сконструированы на основе одного из вариантов, содержащих тяжелую и легкую цепи VH4 и VK2, соответственно. Пример последовательности VK2 представлен в SEQ ID NO: 49. Пример последовательности VH4 для hIgG4 (S241P) представлен в SEQ ID NO: 50, а для hIgG1 - в SEQ ID NO: 51. Далее, были получены следующие нуклеотидные последовательности, оптимизированные для экспрессии аминокислотных последовательностей в клетках CHO: для VK2 нуклеотидная последовательность приведена в SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. Для VH4 IgG4 нуклеотидная последовательность приведена в SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 55.

Пример 12а. CAR-T-клетки, экспрессирующие scFv, полученные из гуманизованных вариантов анти-PVR антител, специфически активируются в присутствии клеток опухоли.

Конструкция CAR-T была разработана на основе вариантов H4K2-NTX-1088C и H3K4-NTX-1034C. Аминокислотные последовательности scFv представлены в SEQ ID NO: 56 и 57, соответственно. Родительские клетки Jurkat или клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие анти-hPVR CAR-T (40 тыс./лунку), инкубировали с клетками рака молочной железы A549 или MDA-231 (PVR-положительные) при соотношении E:T 1:1 в течение 24 ч. Как показано на фиг. 18, оба CAR-T-драйвера приводили к секреции сотен пикограмм IL2, тогда как секреция IL2 в родительских клетках Jurkat не обнаруживалась в присутствии указанных мишеней. Секрецию IL2 количественно определяли с использованием Biolegend hIL2 (кат. 431804). Указанные результаты позволяют предположить, что основанный на α PVR драйвер CAR-T обладает высокой функциональностью, индуцируя активацию T-клеток в присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих PVR.

Чтобы изучить уничтожение опухолевых клеток посредством CAR-T, в 12-луночный планшет с вариантами CAR-T-PVR (NTX-1088C или NTX1034C) высевали 200 тыс. клеток A549 или MDA-231 при E:T 0,4 и 0,8 к 1 (на основе позитивного GFP), соответственно, в среде NK в течение 72 ч. Гибель опухолевых клеток оценивали с использованием стандартного протокола CTG (Promega G9241). Как показано на фиг. 19A-19C, оба варианта PVR демонстрировали более чем 2-кратное увеличение уничтожения клеток MDA-231 и 8-кратное увеличение уничтожения клеток A549 по сравнению с активированными PBMC. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что конструкции α PVR CAR-T значительно повышают эффективность уничтожения мишеней, экспрессирующих PVR.

Пример 13. Эффективное уничтожение гематологических клеток-мишеней с помощью α PVR CAR-T.

Конструкция CAR-T была разработана на основе вариантов H4K2-NTX-1088C и H3K4-NTX-1034C. Последовательности scFv представлены в SEQ ID NO: 56 и 57, соответственно.

Чтобы проверить уничтожение гематологических опухолевых клеток с помощью CAR-T, 20 тыс./лунку клеток K562 высевали в 96-луночные планшеты либо отдельно, либо с вариантами CAR-T-PVR (NTX-1088C или NTX1034C) при E:T в диапазоне от 3,4 до 0,22 к 1, в RPMI с добавлением 100 МЕ IL-2/мл, и инкубировали в течение 18 ч. Гибель опухолевых клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. И NTX-1034C, и NTX-1088C были чрезвычайно эффективны в уничтожении мишеней при высоких значениях E:T. Явное преимущество NTX-1088C над NTX-1034C при более низких E:T, вероятно, связано с умеренными уровнями PVR, экспрессирующимися на K562. Эти результаты позволяют предположить, что α PVR CAR-T может быть эффективен против гематологических опухолей, экспрессирующих PVR.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизованное антитело, специфически связывающееся с рецептором полиовируса человека (PVR), или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, причем вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и вариационная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

2. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариационная область тяжелой цепи содержит:

i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 10-12; и

ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков тяжелой цепи (FR):

(A) FR-H1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 22 и 26;

(B) FR-H2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 23 и 28;

(C) FR-H3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 24, 27 и 29; и

(D) FR-H4, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и 25.

3. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, где переменная область легкой цепи содержит:

i) набор из трех последовательностей CDR, содержащих последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13-15; и

ii) набор из четырех последовательностей каркасных участков легкой цепи:

(A) FR-L1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 34;

(B) FR-L2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31 и 37;

(C) FR-L3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 35 и 36; и

(D) FR-L4, представляющий собой SEQ ID NO: 33.

4. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

5. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

6. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 и 5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

7. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где гуманизированное антитело представляет собой антитело IgG; или где гуманизированное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG4 или IgG1.

8. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, где гуманизированное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG4, содержащую замену остатка серина на пролин в положении 228 указанной константной области тяжелой цепи IgG4.

9. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, или его аналог, по меньшей мере на 90% идентичный любой из указанных последовательностей.

10. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где гуманизированное антитело ингибирует связывание рецептора полиовируса (PVR) по меньшей мере с одним из T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), CD96 и CD226.

11. Нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10.

12. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий комбинацию последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела по любому из пп.1-10.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или CAR по п.12, а также фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

14. Применение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10, CAR по п.12, или фармацевтической композиции по п.13 для увеличения поверхностной экспрессии и/или передачи сигнала CD226 в CD8+ T- или NK-клетках.

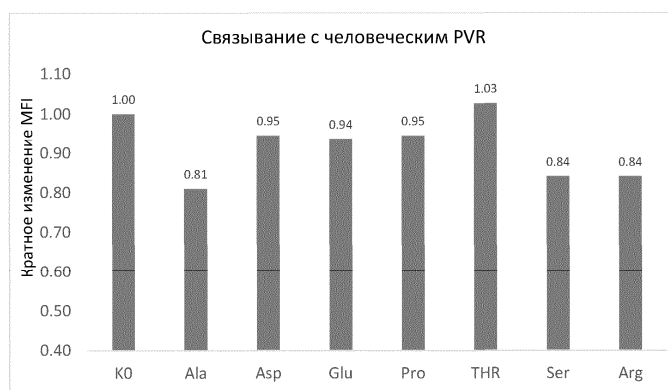
15. Применение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10, CAR по п.12 или фармацевтической композиции по п.13 для лечения рака у индивидуума.

Образец IgG4 S241P	K_a (1/Мсек)	K_d (1/сек)	K_D (нМ)	Относительная K_D^*	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
VH0/Vk0 WT	1.40×10^5	7.15×10^{-4}	5.12	1.00	90.5	0.24
VH0/Vk0 Ala ₅₆	1.54×10^5	7.01×10^{-4}	4.57	0.89	67.5	0.08
VH0/Vk0 Asp ₅₆	1.95×10^5	6.37×10^{-4}	3.27	0.64	89.6	0.08
VH0/Vk0 Glu ₅₆	1.84×10^5	6.53×10^{-4}	3.55	0.69	72.9	0.10
VH0/Vk0 Ser ₅₆	1.52×10^5	7.01×10^{-4}	4.61	1.05	76.4	0.16
VH0/Vk0 Pro ₅₆	1.38×10^5	1.05×10^{-3}	7.58	1.48	79.7	0.09
VH0/Vk0 Thr ₅₆	1.56×10^5	6.88×10^{-4}	4.40	0.86	66.4	0.07

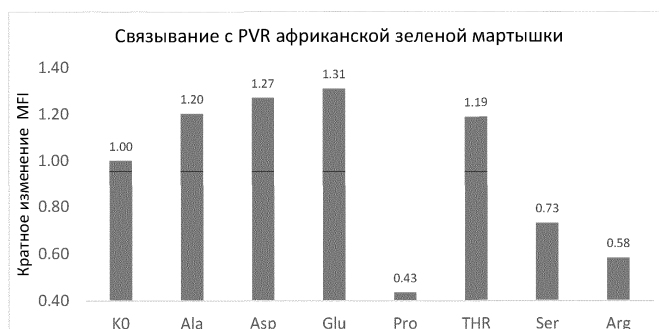
Фиг. 1А

Антитело IgG4 (S241P)	IC50 (нМ)	Относительная IC50 по отношению к WT
WT	0.77	1.00
Ala ₅₆	0.57	0.73
Asp ₅₆	0.66	0.85
Arg ₅₆	0.92	1.19
Glu ₅₆	0.55	0.71
Pro ₅₆	0.85	1.10
Thr ₅₆	0.79	1.02
Ser ₅₆	0.75	0.96

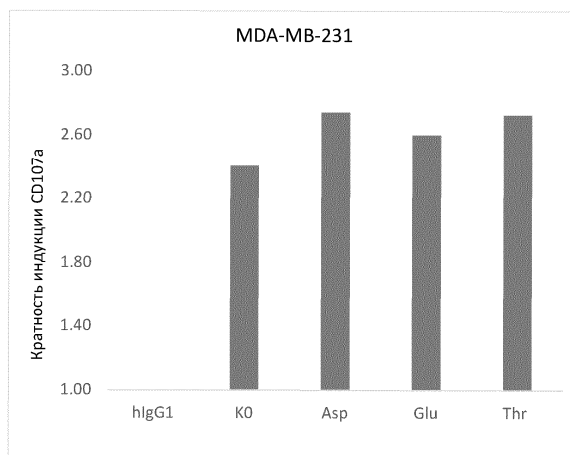
Фиг. 1В



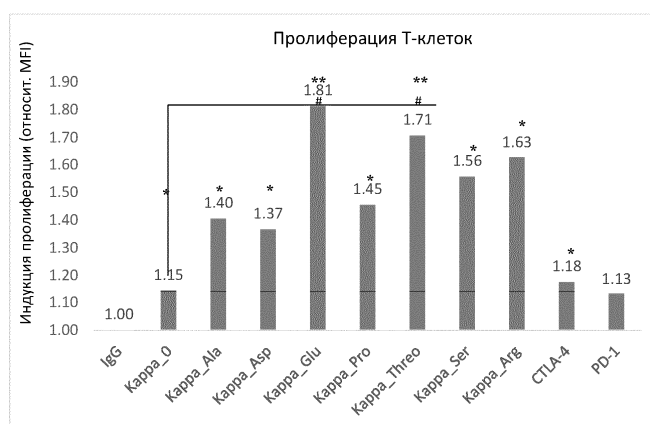
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4

Антитело	K _D (нМ)	Относительная K _D *	Chi ² (RU ²)
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH0/Vk0	5.54	1.00	0.136
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH0/Vk1	4.03	0.73	0.0478
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH1/Vk0	4.50	0.81	0.0654
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH1/Vk1	4.17	0.75	0.155
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH1/Vk2	4.01	0.72	0.0449
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH1/Vk3	4.98	0.90	0.0655
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH1/Vk4	69.30	12.51	0.00276
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH2/Vk1	3.96	0.71	0.0559
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH2/Vk2	4.67	0.84	0.0666
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH2/Vk3	5.14	0.93	0.0577
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH2/Vk4	78.30	14.13	0.00322
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH3/Vk1	4.56	0.82	0.144
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH3/Vk2	4.32	0.78	0.0503
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH3/Vk3	5.42	0.98	0.0766
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH3/Vk4	75.20	13.57	0.0021
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH4/Vk1	4.62	0.83	0.0398
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH4/Vk2	6.76	1.22	0.0451
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH4/Vk3	5.11	0.92	0.0408
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH4/Vk4	96.00	17.33	0.00499
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH5/Vk1	5.91	1.07	0.0851
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH5/Vk2	5.68	1.03	0.0377
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH5/Vk3	7.41	1.34	0.0452
IgG4(S ₂₄₁ P) _{N56E} _VH5/Vk4	79.80	13.86	0.00509

Фиг. 5А

Вариант антитела	EC ₅₀ (нМ)	Относит. EC ₅₀ (нМ)
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH0/Vk0	0.79	1.00
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH2/Vk2	0.64	0.81
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH2/Vk3	0.60	0.76
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH3/Vk2	0.52	0.66
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH3/Vk3	0.53	0.68
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH4/Vk2	0.67	0.86
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH4/Vk3	0.59	0.75
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH5/Vk2	0.64	0.82
IgG4(S ₂₄₁ P)_N56E_VH5/Vk3	0.57	0.72

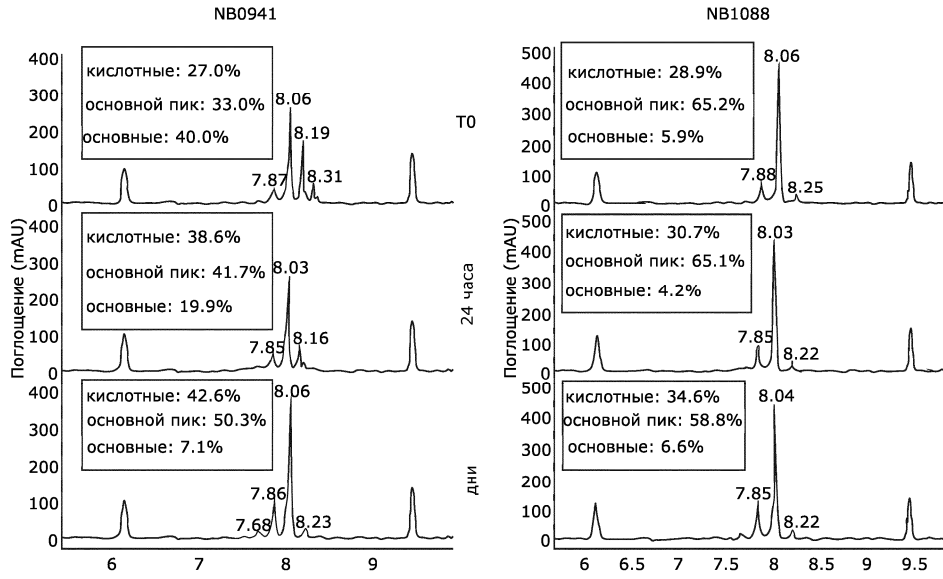
Фиг. 5В

Вариант антитела	Изотип IgG1 (мкг/мл)	Изотип IgG4(S241P) (мкг/мл)
VH0/Vk0	11.9	8.7
VH0/Vk1	45.0	54.3
VH1/Vk0	8.5	7.1
VH1/Vk1	33.8	54.2
VH1/Vk2	33.7	35.6
VH1/Vk3	35.7	73.2
VH1/Vk4	47.6	51.4
VH2/Vk1	34.6	69.0
VH2/Vk2	33.4	37.7
VH2/Vk3	47.1	86.4
VH2/Vk4	29.4	61
VH3/Vk1	32.2	44.9
VH3/Vk2	22.0	46.6
VH3/Vk3	32.5	90.0
VH3/Vk4	18.2	105.4
VH4/Vk1	38.6	46.3
VH4/Vk2	46.0	108.7
VH4/Vk3	59.6	77.5
VH4/Vk4	45.8	58.4
VH5/Vk1	39.1	56.1
VH5/Vk2	45.1	52.5
VH5/Vk3	29.6	62.2
VH5/Vk4	18.2	76.7

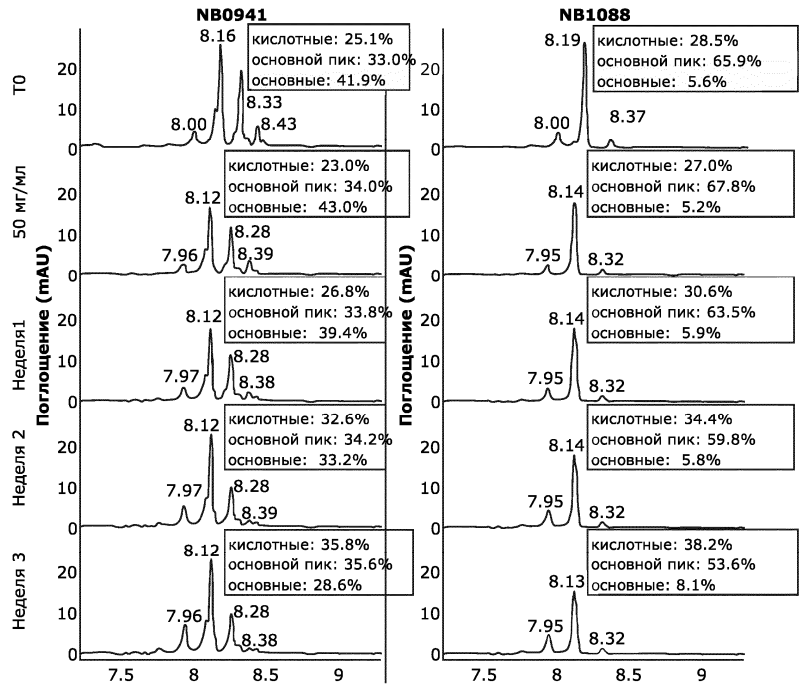
Фиг. 6А

Вариант VH	% идентичности с ближайшим геном человеческой зародышевой линии
VH2	75.5
VH3	78.6
VH4	80.6
VH5	82.7
Вариант Vk	% идентичности
Vk2	83
Vk3	84.2

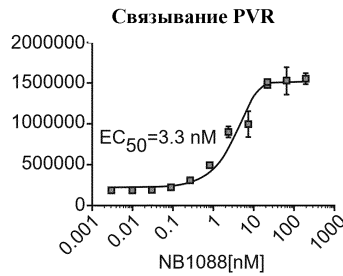
Фиг. 6В



Фиг. 7А

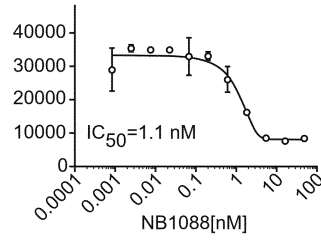


Фиг. 7В



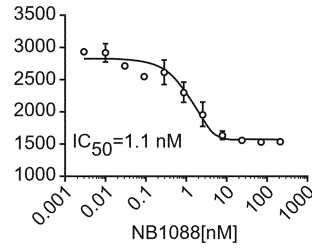
Фиг. 8А

Конкуренция с TIGIT



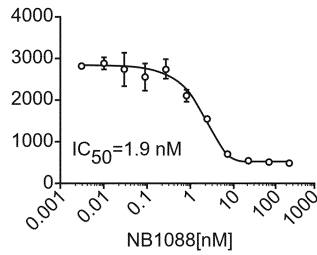
Фиг. 8B

Конкуренция с CD96

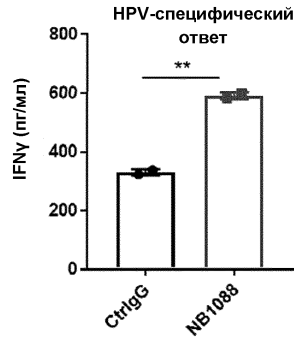


Фиг. 8C

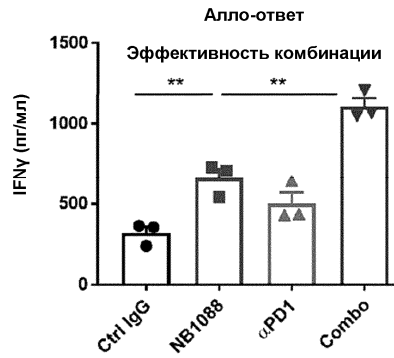
Конкуренция с CD226



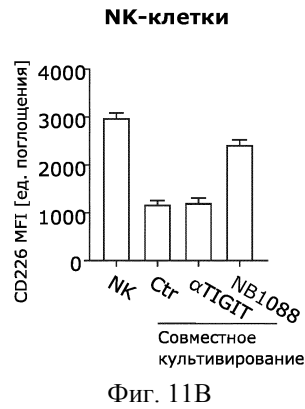
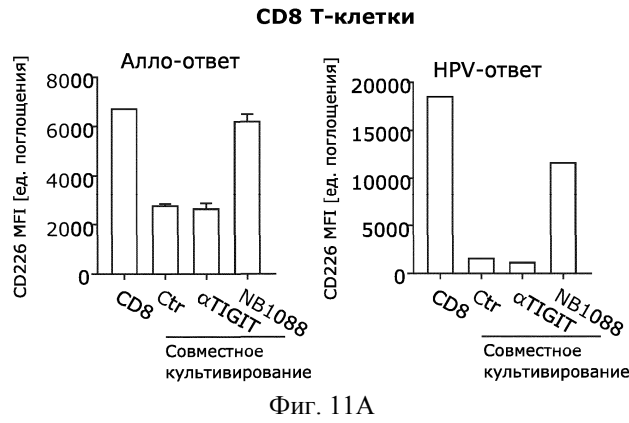
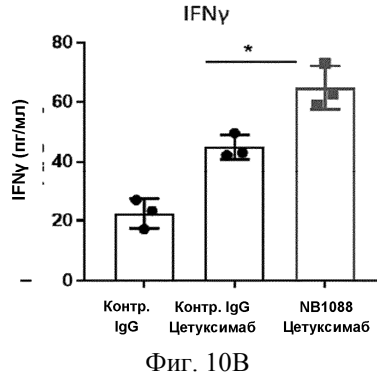
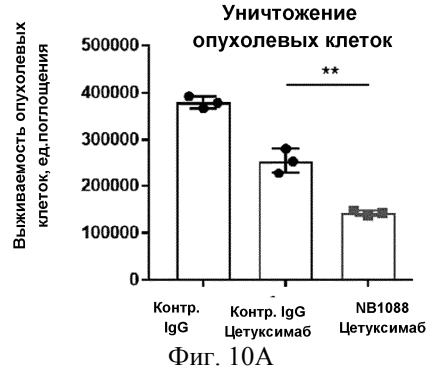
Фиг. 8D



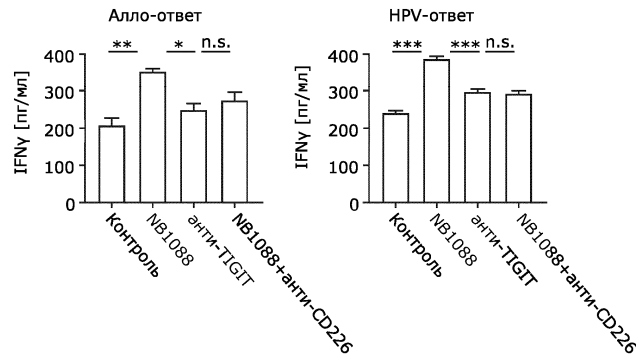
Фиг. 9A



Фиг. 9B

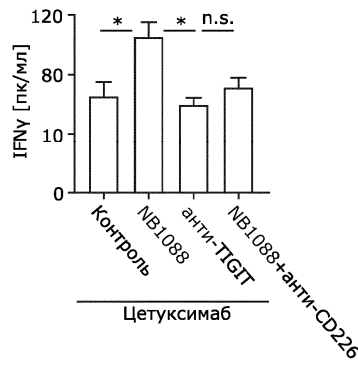


CD8 T-клетки

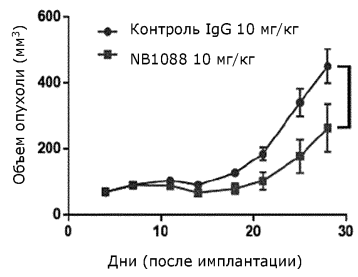


Фиг. 12А

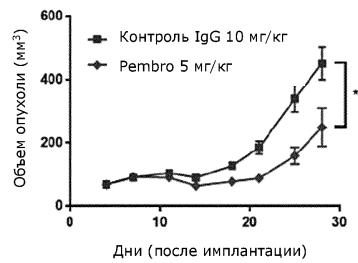
НК-клетки



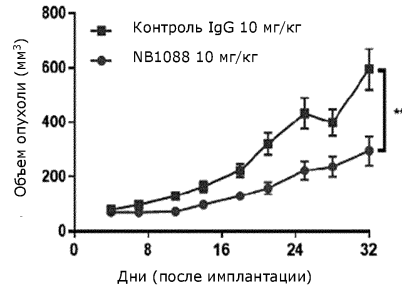
Фиг. 12В



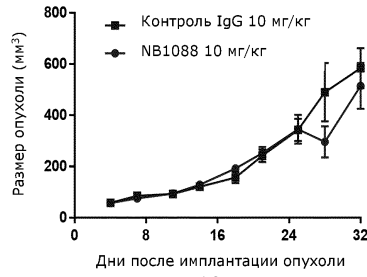
Фиг. 13А



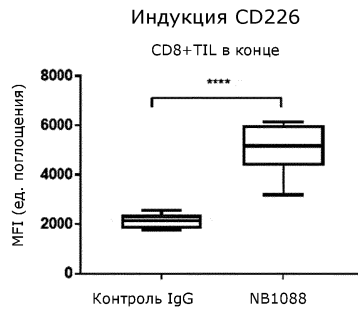
Фиг. 13В



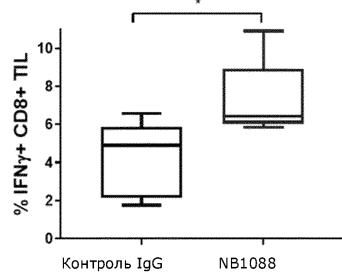
Фиг. 13С



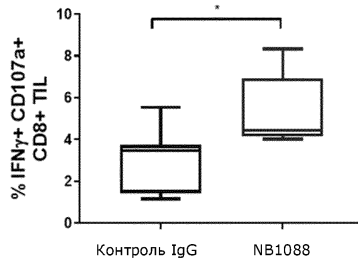
Фиг. 13D



Фиг. 13E



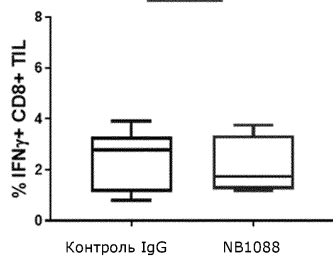
Фиг. 14А



Фиг. 14В

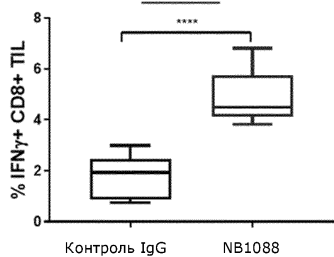
045980

CD8⁺ CD226⁻ TIL



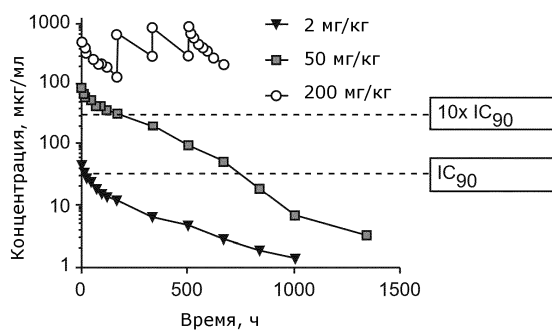
Фиг. 14С

CD8⁺ CD226⁺ TIL



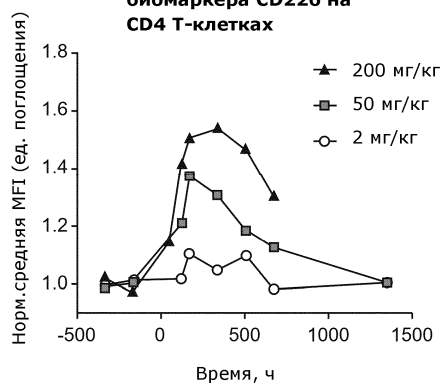
Фиг. 14D

Фармакокинетика

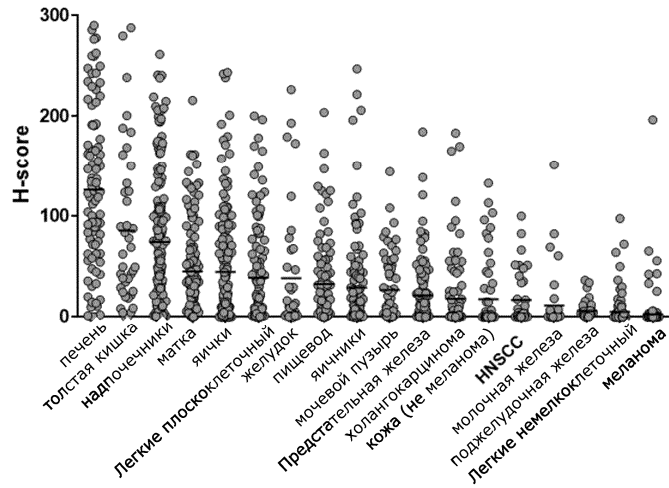


Фиг. 15А

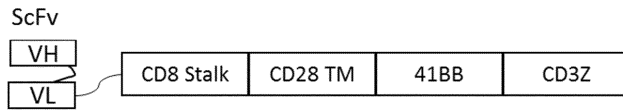
**Фармакодинамика
биомаркера CD226 на
CD4 Т-клетках**



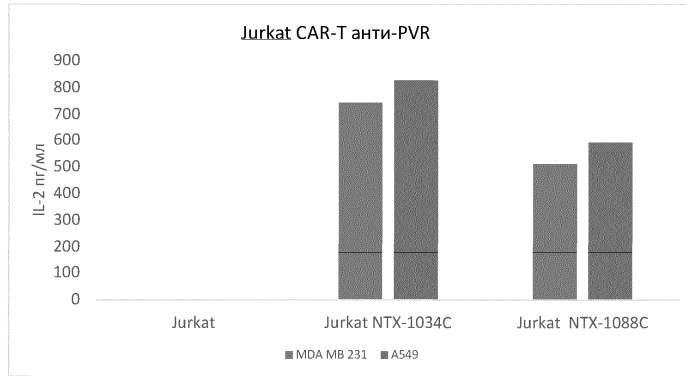
Фиг. 15В



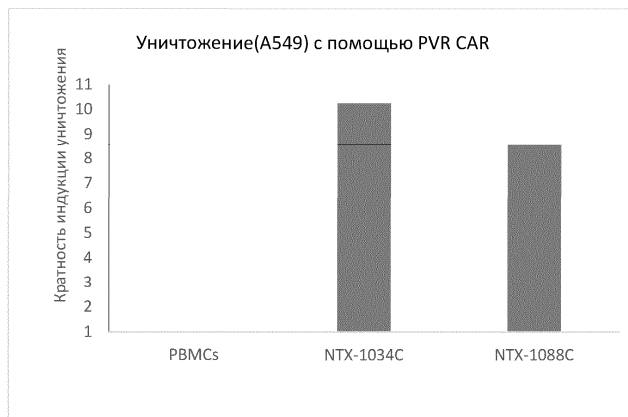
Фиг. 16



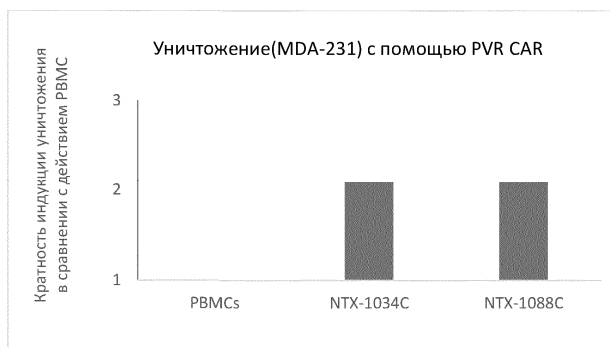
Фиг. 17



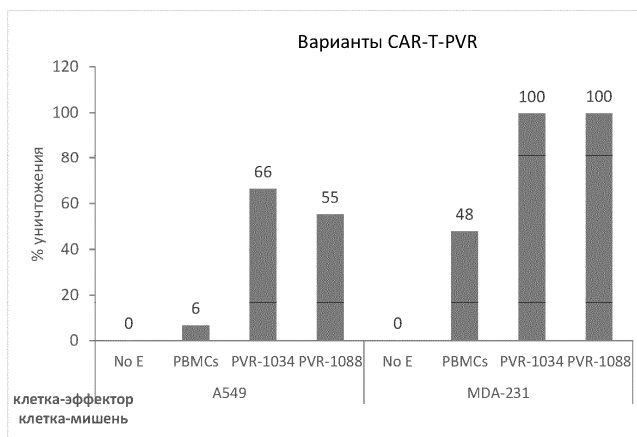
Фиг. 18



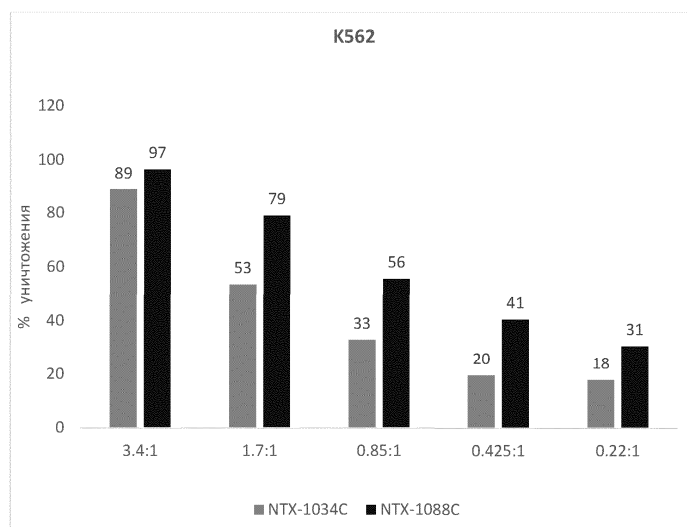
Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 19С



Фиг. 20

