

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092279 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.24

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

(22) Дата подачи заявки
2019.03.22

(54) АНТИТЕЛА К МІСА И/ИЛИ МІСВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/647,556; 62/667,170

(32) 2018.03.23; 2018.05.04

(33) US

(86) PCT/US2019/023693

(87) WO 2019/183551 2019.09.26

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Куне Майкл Рене, Корман Алан Дж.,
Хаунг Хайчун, Йин Йиминг, Грациано
Роберт Ф., Безман Натали А., Стронг
Павел, Хуанг Ричард И., Чэн Гуодонг,
Сринивасан Мохан, Ли Питер Сунг
Кеун, Камдере Гамзе Озлем (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены антитела, которые специфически связывают МІСА/В человека, и способы их применения. Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способам лечения рака у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела к МІСА/В.

202092279

A1

A1

202092279

АНТИТЕЛА К МІСА И/ИЛИ МІСВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0001] Содержание поданного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (название: 3338_101PC02_Seqlisting_ST25.txt; размер: 154660 байт; и дата создания: 18 марта 2019 года), поданного вместе с заявкой, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Белки А и В, родственные цепям класса I главного комплекса гистосовместимости (MICA/B), представляют собой высокополиморфные белки клеточной поверхности, родственные гликопротеинам I класса MHC. Они содержат три внеклеточных домена ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$), трансмембранную область и цитоплазматический конец, и действуют как лиганды с целью стимуляции активирующего рецептора, NKG2D, экспрессируемого на поверхности NK, $\gamma\delta$ T, CD8+ $\alpha\beta$ T и NKT-клеток. Как правило, MICA/B конститутивно экспрессируются на низких уровнях на поверхности эпителиальных, эндотелиальных клеток, фибробластов и миелоидных клеток. Однако, уровень их экспрессии может быть повышен, или они могут экспрессироваться *de novo* в стрессовых условиях, как, например, во время развития рака, инфекций, ответа на повреждение ДНК и при аутоиммунных состояниях. Соответственно, экспрессия MICA/B выступает в качестве сигнала клеточного стресса, и вовлечение NKG2D посредством MICA/B обеспечивает активацию NK-клеток и костимуляцию T-клеток, что обуславливает запуск иммуноэффекторных функций, таких как цитотоксичность и продукция цитокинов. Bauer, Science 1999; 285: 727-9. Diefenbach et al., Nat Immunol. 2000; 1:119-26. Groh et al., Nat Immunol. 2001; 2:255-60. Опухолевые клетки, однако, обладают механизмами, которые предупреждают опосредованный NKG2D ответ путем отщепления MICA/B от поверхности клетки, что приводит в результате как к снижению плотности MICA/B на поверхности, так и к образованию растворимых MICA/B (sMICA/B), что обуславливает снижение уровня экспрессии NKG2D на поверхности цитотоксических эффекторных клеток. Groh et al., Nature 2002; 419:734-8. Salih, J. Immunol. 2002; 169:4098-4102. На поверхности опухолевых клеток домен $\alpha 3$ MICA/B взаимодействует с дисульфид-изомеразой/шапероном, белком 5 эндоплазматического ретикула (ERp5), индуцируя конформационное изменение, обеспечивающее возможность расщепления MICA/B протеазами, включая дизинтегрин и металлопротеазы, ADAM10 и ADAM17. Kaiser, Nature 2007; 447:482-6.

[0003] В настоящее время идентифицировано приблизительно 100 аллелей MICA, кодирующих 79 вариантов белка, и 40 аллелей MICB, кодирующих 26 вариантов белка (база данных полиморфизмов генов иммунной системы (Immuno Polymorphism Database) Европейского Института Биоинформатики (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI): <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (по состоянию на 8 декабря 2017 года)). Экспрессия MICA/B была обнаружена в широком спектре типов опухолей, причем высокий уровень экспрессии ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. Spear, Cancer Immunity 2013; 13. Ghadially et al., Br. J. Cancer 2017; 116:1208-17. Поскольку было показано, что длительное воздействие высоких концентраций sMICA приводит к снижению активности NKG2D на поверхности CD8 T- и NK-клеток, образование sMICA/B рассматривалось как механизм ускользания опухоли от иммунного ответа. Groh et al., Nat. Immunol. 2001; 2:255-60. Salih, J. Immunol. 2002; 169:4098-4102. Белки sMICA/B были идентифицированы во многих типах опухолей человека, включая меланому, рак легкого, рак толстой кишки, рак яичника, рак молочной железы, рак предстательной железы и миелому. Zhang et al., Sci. Adv. 2017; 3:e1602133. Уровни sMICA коррелировали с низкой выживаемостью у пациентов с метастатической меланомой, которую лечили антителом к CTLA-4, ипилимумабом. Koguchi, Cancer Res. 2015; 75:5084-92. Кроме того, у пациентов с меланомой, у которых наблюдали ответ на ипилимумаб, было показано образование индуцированных терапией антител к MICA/B; у некоторых из этих пациентов наблюдали уменьшение уровней sMICA и клинические признаки противоопухолевой активности. Zhang et al., Sci. Adv. 2017; 3:e1602133. Jinushi, PNAS. 2006; 103:9190-9195.

[0004] Степень, до которой у вирусов и опухолей развились механизмы уклонения от обнаружения посредством NKG2D, указывает на то, что стратегии терапии, направленные на восстановление или усиление NKG2D-зависимой активации NK- и T-клеток, могут быть эффективными. Следовательно, существует потребность в получении и отборе антител к MICA/B, которые связываются с областью, проксимальной по отношению к сайту связывания ERp5 на MICA/B, и/или обеспечивают сохранение MICA/B на поверхности клетки, так что он может эффективно вовлекать NKG2D, что приводит к усилению противоопухолевой активности у пациентов.

КРАТКОЕ РАСКРЫТИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Один аспект настоящего раскрытия относится к антителу, которое специфически связывается с белком А, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или белком В, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой

цепи (VL); причем VH содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, VH-CDR2 и VH-CDR3 и VL содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; причем VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37 и 47. Согласно некоторым вариантам осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36 и 46. Согласно некоторым вариантам осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35 и 45. Согласно некоторым вариантам осуществления VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38 и 48. Согласно некоторым вариантам осуществления VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39 и 49. Согласно некоторым вариантам осуществления VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40 и 50.

[0006] Согласно некоторым вариантам осуществления (a) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10; (b) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20; (c) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30; (d) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:36,

VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40; или (е) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50.

[0007] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующего: (а) антитело ингибирует сбрасывание MICA опухолевой клеткой; (b) антитело обеспечивает повышение мембраносвязанного MICA на поверхности опухолевой клетки; (с) антитело обеспечивает снижение уровня растворимого MICA в сыворотке крови у пациента; (d) антитело опосредует усиленные ADCC и/или ADCP; (е) антитело опосредует усиленные процессирование и/или перекрестное представление антигена клеткой; (f) антитело обеспечивает ингибирование роста опухоли и/или метастазирования; (g) антитело обеспечивает уменьшение объема опухоли; (h) антитело обеспечивает повышение выживаемости без прогрессирования; (i) антитело обеспечивает повышение общей выживаемости; и (j) любая комбинация указанного.

[0008] Согласно некоторым вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42. Согласно некоторым вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42.

[0009] Согласно некоторым вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере

приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44. Согласно некоторым вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44.

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления (a) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4; (b) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14; (c) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24; (d) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34; или (e) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44.

[0011] Согласно некоторым вариантам осуществления (a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60; (b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60; (c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64; (d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68; или (e) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72.

[0012] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий один или несколько аминокислотных остатков MICA человека, выбранных из группы, состоящей из G254, D255, L257, Y264, W267 и любой их

комбинации, соответствующих SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий G254, D255, L257, Y264 и W267, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки W150-M163, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки Y231-T238, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки D255-Q265, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки W253-W267, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220 и T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий R240, Q241, D242, V244 и R279, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий P258, G260, G262 и Y264, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей

мере 10 остатков, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере два остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере четыре остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере шесть остатков, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

[0013] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианта. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит константную область в тяжелой цепи и причем константная область содержит мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO: 58.

[0014] Другой аспект настоящего раскрытия относится к антителу, которое специфически связывается с белком А, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или белком В, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащему вариabельную область тяжелой цепи (VH) и вариabельную область легкой цепи (VL); причем VH содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, VH-CDR2 и VH-CDR3 и VL содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; причем VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2

содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10; и причем антитело является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит константную область в тяжелой цепи, которая содержит мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO: 58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело является гипофукозилированным.

[0015] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к антителу, которое специфически связывается с белком А, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или белком В, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60, причем антитело является нефукозилированным.

[0016] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело продуцируется клеточной линией, у которой уровень экспрессии фукозилтрансферазы понижен, или указанная экспрессия устранена.

[0017] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к полинуклеотиду или набору полинуклеотидов, кодирующим описанное в настоящем документе антитело. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к вектору или набору векторов, содержащим полинуклеотид или набор полинуклеотидов. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к клетке-хозяину, содержащей антитело, полинуклеотид или набор полинуклеотидов или вектор.

[0018] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к иммуноконъюгату, содержащему антитело и терапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из цитотоксина,

лекарственного средства, не являющегося цитотоксическим, радиоактивного вещества, второго антитела, фермента, антинеопластического средства и любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксин выбран из группы, состоящей из доластатина, монометилауристатина Е (ММАЕ), майтанзина, дуокармицина, калихеамицина, пирролобензодиазепина, дуокармицина, центанамицина, SN38, доксорубицина, их производного, их синтетического аналога и любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксин включает цитотоксин А.

[0019] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, вектор или набор векторов или иммуноконъюгат и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит второе антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело специфически связывает белок, выбранный из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGF β , IL-10, IL-8, IL-2, CD96, VISTA, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CD27, GITR и любой их комбинации.

[0020] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту антитела, полинуклеотида или набора полинуклеотидов, вектора или набора векторов, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или фармацевтической композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления рак включает опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает применение у субъекта второго средства терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии содержит эффективное количество антитела, которое специфически связывает белок, выбранный из индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A, CD27, CD96, глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка (GITR) и медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM), белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганда 1 белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1), CTLA-4, В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного белка 3, содержащего иммуноглобулиновый и муциновый домен (TIM-3), белка, кодируемого геном 3 активации лимфоцитов (LAG-3), рецептора A2a аденозина (A2aR), лектин-подобного рецептора G1 клеток-киллеров (KLRG-1), рецептора 2B4 естественных клеток-киллеров (CD244), CD160, Т-клеточного иммунорецептора с Ig- и ITIM-доменами (TIGIT) и рецептора супрессора активации Т-клеток, содержащего IgV-подобный домен (VISTA), KIR, TGF β , IL-10, IL-8, IL-2, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CEACAM-1, CD52, HER2 и любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии

содержит эффективное количество пегилированного IL-10, IL-10-Fc или пегилированного IL-2. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии содержит химиотерапевтическое средство от рака, облучение, средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, и/или средство, которое повышает выживаемость NK- и/или CD8+ T-клеток.

[0021] Другие признаки и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны толковаться как ограничивающие. Содержание всех цитируемых ссылок, включая научные статьи, газетные статьи, данные GenBank, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящей заявке, явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0022] На фигурах 1A-1D представлены результаты выравниваний последовательностей антитела к MICA/B MICA.36 (19G6), варибельной области тяжелой цепи (фигуры 1A-1B; нуклеотидная: SEQ ID NO: 1; аминокислотная: SEQ ID NO: 2) и варибельной области легкой цепи (фигуры 1C-1D; нуклеотидная: SEQ ID NO: 3; аминокислотная: SEQ ID NO: 4). На фигурах 1A и 1C показаны нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные последовательности для MICA.36 (19G6), варибельной области тяжелой цепи (фиг. 1A) и варибельной области легкой цепи (фиг. 1C). На фигурах 1B и 1D показаны последовательности зародышевой линии в сравнении с последовательностями MICA.36 (19G6) («входная») для варибельной области тяжелой цепи (фиг. 1B) и варибельной области легкой цепи (фиг. 1D). Определяющие комплементарность области (CDR), определенные согласно нумерации по Kabat, обозначены горизонтальными линиями и соответствующим образом подписаны (фигуры 1A-1D).

[0023] На фигурах 2A-2F представлены результаты выравниваний последовательностей антитела к MICA/B MICA.52 (16A5), варибельной области тяжелой цепи (фигуры 2A-2B; нуклеотидная: SEQ ID NO: 11; аминокислотная: SEQ ID NO: 12), варибельной области 1 легкой цепи (фигуры 2C-2D; нуклеотидная: SEQ ID NO: 13; аминокислотная: SEQ ID NO: 14) и варибельной области 2 легкой цепи (фигуры 2E-2F; нуклеотидная: SEQ ID NO: 127; аминокислотная: SEQ ID NO: 128). На фигурах 2A, 2C и 2E показаны нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные последовательности для антитела к MICA/B 16A5, варибельной области тяжелой цепи (фиг. 2A) и варибельных областей 1 (MICA.52) и 2 (MICA.53) легкой цепи (фигуры 2C и 2E соответственно). На фигурах 2B, 2D и 2F показаны последовательности зародышевой

линии в сравнении с последовательностями MICA.52 или MICA.53 (16A5) («входная») для варибельной области тяжелой цепи (фиг. 2B) и варибельных областей 1 и 2 легкой цепи (фигуры 2D и 2F). Определяющие комплементарность области (CDR), определенные согласно нумерации по Kabat, обозначены горизонтальными линиями и соответствующим образом подписаны (фигуры 2A-2F).

[0024] На фигурах 3A-3D представлены результаты выравниваний последовательностей антитела к MICA/B MICA.54 (24G11), варибельной области тяжелой цепи (фигуры 3A-3B; нуклеотидная: SEQ ID NO: 21; аминокислотная: SEQ ID NO: 22) и варибельной области легкой цепи (фигуры 3C-3D; нуклеотидная: SEQ ID NO: 23; аминокислотная: SEQ ID NO: 24). На фигурах 3A и 3C показаны нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные последовательности для антитела к MICA/B MICA.54 (24G11), варибельной области тяжелой цепи (фиг. 3A) и варибельной области легкой цепи (фиг. 3C). На фигурах 3B и 3D показаны последовательности зародышевой линии в сравнении с последовательностями MICA.54 (24G11) («входная») для варибельной области тяжелой цепи (фиг. 3B) и варибельной области легкой цепи (фиг. 3D). Определяющие комплементарность области (CDR), определенные согласно нумерации по Kabat, обозначены горизонтальными линиями и соответствующим образом подписаны (фигуры 3A-3D).

[0025] На фигурах 4A-4D представлены результаты выравниваний последовательностей антитела к MICA/B MICA.2 (3F5), варибельной области тяжелой цепи (фигуры 4A-4B; нуклеотидная: SEQ ID NO: 31; аминокислотная: SEQ ID NO: 32) и варибельной области легкой цепи (фигуры 4C-4D; нуклеотидная: SEQ ID NO: 33; аминокислотная: SEQ ID NO: 34). На фигурах 4A и 4C показаны нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные последовательности для антитела к MICA/B MICA.2 (3F5), варибельной области тяжелой цепи (фиг. 4A) и варибельной области легкой цепи (фиг. 4B). На фигурах 4B и 4D показаны последовательности зародышевой линии в сравнении с последовательностями MICA.2 (3F5) («входная») для варибельной области тяжелой цепи (фиг. 4B) и варибельной области легкой цепи (фиг. 4D). Определяющие комплементарность области (CDR), определенные согласно нумерации по Kabat, обозначены горизонтальными линиями и соответствующим образом подписаны (фигуры 4A-4D).

[0026] На фигурах 5A-5D представлены результаты выравниваний последовательностей к MICA/B 71C2, варибельной области тяжелой цепи (фигуры 5A-5B; нуклеотидная: SEQ ID NO: 41; аминокислотная: SEQ ID NO: 42) и варибельной области легкой цепи (фигуры 5C-5D; нуклеотидная: SEQ ID NO: 43; аминокислотная: SEQ ID NO:

44). На фигурах 5А и 5С показаны нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные последовательности для антитела к МІСА/В 71С2, вариабельной области тяжелой цепи (фиг. 5А) и вариабельной области легкой цепи (фиг. 5В). На фигурах 5В и 5D показаны последовательности зародышевой линии в сравнении с последовательностями 71С2 («входная») для вариабельной области тяжелой цепи (фиг. 5В) и вариабельной области легкой цепи (фиг. 5D). Определяющие комплементарность области (CDR), определенные согласно нумерации по Kabat, обозначены горизонтальными линиями и соответствующим образом подписаны (фигуры 5А-5D).

[0027] На фигурах 6А-6Н показаны графические представления кинетических показателей аффинности связывания антител к МІСА/В: МІСА.36 (фигуры 6А-6D) и МІСА.38 (фигуры 6Е-6Н) в отношении аллельных вариантов МІСА МІСА*002 (фигуры 6А и 6Е), МІСА*004 (фигуры 6В и 6F), МІСА*008 (фигуры 6С и 6G) и МІСА*009 (фигуры 6D и 6Н), как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0028] На фигурах 6І-6L показаны графические представления кинетических показателей аффинности связывания антител к МІСА/В: МІСА.2 (фиг. 6І), 16А5 (фиг. 6J), 19G6 (фиг. 6K) и 71С2 (фиг. 6L) в отношении аллельных вариантов МІСА МІСА*002, МІСА*004, МІСА*008 и МІСА*009, как измерено с помощью SPR с применением прибора Biacore 3000.

[0029] На фигурах 7А-7G показаны графические представления специфической связывающей активности МІСА.36 с антигенами МІСА/В, экспрессируемыми клетками *in vitro*, проанализированной с использованием графиков Скэтчарда. Фиг. 7А представляет собой калибровочную кривую концентрации подвергнутого титрованию антитела (ось х; антитело, нМ), построенную против ассоциированного импульса в минуту (ось у; CPM). На фигурах 7В-7F показано специфическое связывание, общее связывание и неспецифическое связывание (NSB) МІСА.36 с МІСА*008 человека (фиг. 7В), МІСВ*005 человека (фиг. 7С) и МІСА/В яванского макака (клоны №4 и №6) (фигуры 7D-7E), сверхэкспрессированными в клетках яичника китайского хомячка (СНО); и МІСА/В человека, эндогенно экспрессированным на поверхности клеток 786-О (фиг. 7F) и клеток SW480 (фиг. 7G).

[0030] На фигурах 8А-8N показана аффинность связывания антител к МІСА/В к распространенным аллельным вариантам МІСА или МІСВ, экспрессированным в различных клеточных линиях, полученная с применением сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). На фигурах 8А, 8D, 8F, 8H, 8J и 8L показано связывание 19G6 (8А), 24G11 (фиг. 8D), 71С2 (фиг. 8F), 16А5 (фигуры 8H и 8J, два субклона) и МІСА.2 (фиг. 8L) с антигенами МІСА/В МІСА*002 (треугольники), МІСА*004 (перевернутые треугольники), МІСА*008 (незакрашенные ромбы), МІСА*009

(закрашенные квадраты), МІСА*010 (закрашенные круги) и МІСВ (незакрашенные квадраты), экспрессированными на поверхности клеток СНО, при возрастающих концентрациях антитела. На фигурах 8В, 8Е, 8G, 8I, 8K и 8М показано связывание 19G6 (8В), 24G11 (фиг. 8Е), 71C2 (фиг. 8G), 16A5 (фигуры 8I и 8K) и МІСА.2 (фиг. 8М) с МІСА-экспрессирующими клетками линий 786-О (квадраты), A2058 (треугольники), HeLa (перевернутые треугольники) и RPMI-8226 (круги). На фигурах 8С и 8N показана перекрестная реактивность 19G6 (фиг. 8С) и МІСА.2 (фиг. 8N) в отношении МІСА/В яванского макака, экспрессированного на поверхности клеток СНО клонов №4 и №6, по сравнению с отрицательным контролем (СНО).

[0031] На фигурах 9А-9F показаны результаты картирования эпитопов с применением масс-спектрометрии (MS) водородно-дейтериевого обмена (HDX) для различных антител к МІСА/В. На фигурах 9А-9Е показаны графические представления дифференциального HDX МІСА после взаимодействия с mAb МІСА.2 (фиг. 9А), МІСА.39 (фиг. 9В), МІСА.40 (фиг. 9С), нефукозилированным МІСА.36 с Fc, предусматривающим G236A (фиг. 9D), и МІСА.36 (фиг. 9Е), как измерено с применением масс-спектрометрии. Фиг. 9F представляет собой ленточную диаграмму кристаллической структуры МІСА человека, связанного с рецептором естественных клеток-киллеров (NKG2D), при этом подвергнутый картированию эпитоп МІСА.36 выделен.

[0032] На фигурах 10А-10F показаны результаты картирования эпитопов с применением дрожжевого дисплея для различных антител к МІСА/В. На фигурах 10А-10С показаны отдельные эпитопы для МІСА.36 (фиг. 10А), МІСА.2 (фиг. 10В) и 24G11 (фиг. 10С). На фигурах 10D-10F показаны эти же эпитопы, наложенные на ленточные диаграммы кристаллической структуры МІСА, связанного с NKG2D, для МІСА.2 (фиг. 10D), МІСА.36 (фиг. 10Е) и 24G11 (фиг. 10F).

[0033] На фигурах 11А-11D показаны графические представления уровней поверхностного МІСА или МІСВ, измеренных по максимальной интенсивности флуоресценции на клетках LLC (фиг. 11А), клетках E.G7-Ova (фиг. 11В) и клетках В16 (фигуры 11С и 11D), эктопически экспрессирующих МІСА (фигуры 11А-11С) или МІСВ (фиг. 11D), после воздействия возрастающих концентраций антитела к МІСА/В МІСА.36 (нефукозилированное, вариант G236A; перевернутые треугольники), по сравнению с таковыми после воздействия изотипическим контролем (круги), как измерено с помощью FACS.

[0034] На фигурах 12А-12D показаны графические представления концентрации растворимого МІСА/В, присутствующего в супернатанте клеточной культуры, как измерено с помощью ELISA, для клеток LLC (фиг. 12А), клеток E.G7-Ova (фиг. 12В) и

клеток В16 (фиг. 12С), и клеток СНО (фиг. 12D), эктопически экспрессирующих МІСА/В (фигуры 12А-12С) или рекомбинантный антиген МІСА*008 (фиг. 12D), после воздействия возрастающих концентраций антитела к МІСА/В МІСА.36 (нефукозилированное, вариант G236А; перевернутые треугольники), по сравнению с таковой после воздействия изотипическим контролем (круги).

[0035] На фигурах 13А-13Е показаны графические представления уровней поверхностного МІСА/В на поверхности клеток клеточных линий человека, которые эндогенно экспрессируют МІСА/В. Поверхностную локализацию МІСА/В измеряли по максимальной интенсивности флуоресценции с применением FACS на поверхности клеток SW480 (фиг. 13А), клеток HeLa (фиг. 13В), клеток НСТ-116 (фиг. 13С), клеток 786-О (фиг. 13D) и клеток А2058 (фиг. 13Е) после воздействия возрастающих концентраций антитела к МІСА/В МІСА.36 (нефукозилированное, вариант G236А; перевернутые треугольники), по сравнению с таковыми после воздействия изотипическим контролем (круги).

[0036] На фигурах 14А-14С показаны графические представления концентраций растворимого МІСА/В в культуральной среде клеточных линий человека, которые эндогенно экспрессируют МІСА/В, как измерено с помощью ELISA в среде, в которой культивировали клетки HeLa (фиг. 14А; экспрессирующие МІСА*008), клетки НСТ-116 (фиг. 14В) и клетки 786-О (фиг. 14С), после воздействия возрастающих концентраций антитела к МІСА/В МІСА.36 (нефукозилированное, вариант G236А; перевернутые треугольники), по сравнению с таковыми после воздействия изотипическим контролем (круги).

[0037] На фиг. 15А показано графическое представление уровня антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) после культивирования с возрастающими концентрациями МІСА.36 IgG1 (круги), МІСА.36 IgG1 G236А (закрашенные квадраты), нефукозилированного МІСА.36 IgG1 (NF; перевернутые треугольники) и МІСА.36-IgG1-NF-G236А (треугольники) или изотипическим контролем (hIgG1, незакрашенные квадраты). На фиг. 15В показано графическое представление перекрестного представления антигенов, измеренного по проценту пролиферирующих CD8 Т-клеток, после культивирования с возрастающими концентрациями МІСА.36 IgG1 (перевернутые треугольники), МІСА.36 IgG1 NF (круги), МІСА.36 IgG1 G236А (закрашенные квадраты), МІСА.36-IgG1-NF-G236А (треугольники) или изотипическим контролем (незакрашенные квадраты).

[0038] Фигуры 16А и 16В представляют собой графические изображения процента специфического лизиса МІСА/В-экспрессирующих клеток Raji (фиг. 16А) и клеток А375 (фиг. 16В) после воздействия возрастающих концентраций МІСА.36 NF G236А

(треугольники), MICA.36 IgG1 (перевернутые треугольники), MICA.36 IgG1 NF (круги), MICA.36 IgG1 G236A (закрашенные квадраты) или изотипического контроля (незакрашенные квадраты).

[0039] На фигурах 17A и 17B проиллюстрированы *in vivo* эффекты введенного антитела к MICA/B MICA.36 NF G236A в отношении общей площади опухоли (фиг. 17A) и уровней растворимого MICA/B в сыворотке крови (фиг. 17B) у мышей, у которых индуцировали развитие опухолей в легком.

[0040] На фигурах 18A и 18B показаны результаты двух исследований с повышением дозы у мышей, у которых индуцировали развитие опухолей в легком, в которых измеряли общий размер опухолей после введения разных доз (10 мг/кг (mpk), 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг) антитела к MICA/B MICA.36 NF G236A или изотипического контроля.

[0041] На фигурах 19A-19E показаны результаты введения антитела к MICA/B отдельно или в комбинации с антителом к PD-1 MICA-трансгенным мышам с опухолями EG7-MICA. На фигурах 19A и 19B показаны графические представления среднего (фиг. 19A) и медианного (фиг. 19B) объема опухоли у мышей, которым вводили изотипический контроль (закрашенные круги), MICA.36 mIgG2a и изотипический контроль mIgG1 (квадраты), MICA.36 mIgG1 D265A и изотип mIgG2a (треугольники), mIgG1 D265A к PD-1 и изотип mIgG2a (перевернутые треугольники), MICA.36 mIgG2a и mIgG1 D265A к PD-1 (ромбы) или MICA.36 mIgG1 D265A и mIgG1 D265A к PD-1 (незакрашенные круги). На фиг. 19C показано графическое представление рассчитанного процента ингибирования роста опухоли (TGI%) для каждой группы обработки: 10 мг/кг MICA.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG1 (круги), 10 мг/кг MICA.36 mIgG1 D265A и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (квадраты), 10 мг/кг mIgG1 D265A к PD-1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (треугольники), 10 мг/кг MICA.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG1 D265A к PD-1 (перевернутые треугольники) и 10 мг/кг MICA.36 mIgG1 D265A и 10 мг/кг mIgG1 D265A к PD-1 (ромбы). На фиг. 19D показана выживаемость без прогрессирования (PFS %) для трансгенных мышей с опухолями EG7-MICA после обработки 10 мг/кг изотипа mIgG1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a в качестве двойного контроля (круги), 10 мг/кг MICA.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG1 (квадраты), 10 мг/кг mIgG1 D265A к PD-1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (перевернутые треугольники) или 10 мг/кг MICA.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG1 D265A к PD-1 (ромбы). На фиг. 19E показана концентрация растворимого MICA в сыворотке крови трансгенных мышей с опухолями EG7-MICA после обработки изотипическим контролем, MICA.36 mIgG2a, MICA.36 mIgG1 D265A, mIgG1 D265A к PD-1, MICA.36 mIgG2a и mIgG1 D265A к PD-1 или MICA.36 mIgG1 D265A и mIgG1 D265A к PD-1.

[0042] На фигурах 20А-20D показаны результаты *in vivo* эффектов антител к МІСА/В у трансгенных мышей В6-МІСА с опухолями EG7-МІСА/В. На фигурах 20А и 20В показаны графические представления среднего (фиг. 20А) и медианного (фиг. 20В) объема опухоли у мышей, обработанных 20 мг/кг изотипа mIgG2a (круги), 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипического контроля mIgG2a (квадраты), 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (треугольники) или 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 (перевернутые треугольники). На фиг. 20С показан рассчитанный процент ингибирования роста опухоли (TGI%) для каждой группы обработки: 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (круги), 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (квадраты) и 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 (треугольники). На фиг. 20D показана выживаемость без прогрессирования (PFS %) для трансгенных мышей с опухолями EG7-МІСА/В после обработки 20 мг/кг изотипа mIgG2a (круги), 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипического контроля mIgG2a (квадраты), 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (треугольники) или 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG2a к СТLА-4 (перевернутые треугольники).

[0043] На фигурах 21А-21D показаны результаты *in vivo* эффектов антител к МІСА/В у трансгенных мышей В6-МІСА, которым путем инъекции подкожно вводили опухолевые клетки EG7-МІСА/В. На фигурах 21А и 21В показаны графические представления среднего (фиг. 21А) и медианного (фиг. 21В) объема опухоли у мышей, обработанных 10 мг/кг изотипа mIgG1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (круги), 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG1 (квадраты), 10 мг/кг mIgG1 D265А к PD-1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (треугольники) или 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG2a, и mIgG1 к PD-1 (перевернутые треугольники). На фиг. 21С показано графическое представление рассчитанного процента ингибирования роста опухоли (TGI%) для каждой группы обработки: 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG1 (круги), 10 мг/кг mIgG1 D265А к PD-1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (квадраты) и 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG1 D265А к PD-1 (треугольники). На фиг. 21D показана выживаемость без прогрессирования (PFS %) для трансгенных мышей, которым путем инъекции подкожно вводили опухолевые клетки EG7-МІСА, после обработки 10 мг/кг изотипа mIgG1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (круги), 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг изотипа mIgG1 (квадраты), 10 мг/кг mIgG1 D265А к PD-1 и 10 мг/кг изотипа mIgG2a (треугольники) или 10 мг/кг МІСА.36 mIgG2a и 10 мг/кг mIgG1 D265А к PD-1 (перевернутые треугольники).

[0044] На фигурах 22А-22С показаны результаты картирования эпитопов с применением рентгеноструктурного анализа комплексов. Фиг. 22А является представлением поверхности домена $\alpha 3$ МІСА с остатками эпитопа, показанными черным

цветом, и остальными остатками поверхности, показанными серым цветом. На фигурах 22В и 22С показаны два варианта ориентации Fab МІСА.36 (ленточное представление) в комплексе с доменом $\alpha 3$ МІСА (представление поверхности, как показано на фиг. 22А). Эпитоп для МІСА.36 в домене $\alpha 3$ МІСА показан черным цветом, и остальные остатки домена $\alpha 3$ МІСА показаны серым цветом.

[0045] На фигурах 23А-23В показана аффинность связывания антител к МІСА/В к распространенным аллельным вариантам МІСА, экспрессируемым на поверхности клеток СНО, полученная с применением FACS. На фиг. 23В показаны те же данные, что и на фиг. 23А, но с другой осью Y, для рекомбинантных антител МІСА.5, МІСА.6 и МІСА.7 и изотипического контроля.

[0046] На фигурах 24А-24В показана аффинность связывания антител к МІСА/В к МІСА, эндогенно экспрессируемому на поверхности клеток RPMI-8226, полученная с применением FACS. На фиг. 24В показаны те же данные, что и на фиг. 24А, но с другой осью Y, для Ab2, Ab28, Ab29, изотипического контроля и супернатантов («супер.») клеточных линий СНО, экспрессирующих рекомбинантные антитела МІСА.5, МІСА.6 и МІСА.7.

[0047] На фиг. 25 показаны уровни растворимого МІСА/В в сыворотке крови у трансгенных мышей В6-МІСА через 72 часа и 168 часов после введения антитела МІСА.36-mIgG2a в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг или изотипического контроля.

[0048] На фиг. 26 показаны результаты РК-анализа sМІСА у трансгенных мышей В6-МІСА после введения дозы sМІСА и антитела МІСА.36-mIgG2a или изотипического контроля.

ПОДРОБНОЕ РАСКРЫТИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0049] Настоящее раскрытие относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают белок А, родственный полипептиду I класса МНС (МІСА), и/или белок В, родственный полипептиду I класса МНС (МІСВ) («антитела к МІСА/В»). Согласно некоторым вариантам осуществления МІСА представляет собой МІСА человека. Согласно некоторым вариантам осуществления МІСВ представляет собой МІСВ человека. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают МІСА и/или МІСВ. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта наблюдается рак, и с помощью антитела к МІСА/В лечат рак у субъекта.

I. Термины

[0050] Для того, чтобы настоящее описание могло быть более понятным, сначала приводятся определенные термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

[0051] Следует отметить, что объект в единственном числе относится к одному или нескольким таким объектам; например, подразумевается, что «нуклеотидная последовательность» представляет собой одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Соответственно, формы единственного числа, термины «один или несколько» и «по меньшей мере один» в настоящем документе можно применять взаимозаменяемо.

[0052] Кроме того, выражение «и/или» при применении в настоящем документе следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что выражение «и/или» в контексте такой фразы, как «А и/или В» в настоящем документе включает «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Подобным образом, подразумевается, что выражение «и/или» в контексте такой фразы, как «А, В и/или С», охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0053] Следует понимать, что во всех случаях, где аспекты описаны в настоящем документе с использованием выражения «содержащий», другие аналогичные аспекты, описанные в контексте «состоящий из» и/или «состоящий главным образом из», также предусмотрены.

[0054] Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в данной области, к которой относится настоящее раскрытие. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2-е издание, 2002 г, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3-е издание, 1999 г, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, последняя редакция, 2000 г, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь множества применяемых в настоящем раскрытии терминов.

[0055] Единицы, префиксы и символы обозначены в их принятой согласно Международной системе единиц (СИ) форме. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записаны слева направо в направлении от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбокси-концу. Предусмотренные в

настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, которые могут быть сделаны со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены со ссылкой на описание во всей своей полноте.

[0056] Под применяемым в настоящем документе термином «приблизительно» подразумевается «примерно», «порядка», «около» или «ориентировочно». Если термин «приблизительно» применяется в сочетании с числовым диапазоном, он модифицирует такой диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом термин «приблизительно» может модифицировать числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов, в большую или меньшую сторону (больше или меньше).

[0057] Термин «белок А, родственный полипептиду I класса МНС», или «MICA» в контексте настоящего документа относится к неклассической молекуле I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС). Термин «белок В, родственный полипептиду I класса МНС», или «MICB» в контексте настоящего документа относится к неклассической молекуле I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС). Термин «MICA/B» в контексте настоящего документа относится к MICA и/или MICB.

[0058] MICA представляет собой экспрессируемый в природе гликозилированный и полиморфный белок, который обычно заякорен в клеточной мембране. Расщепление мембраносвязанного MICA металлопротеазами матрикса и протеиназой ADAM приводит к высвобождению растворимой формы MICA во внеклеточный матрикс. MICA является лигандом NKG2D, который представляет собой рецептор, экспрессируемый на поверхности естественных клеток-киллеров (NK), CD8 Т-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток. В нормальных клетках экспрессия MICA индуцируется во время стресса, и MICA действует как сигнал для индукции опосредованного NK- и Т-клетками цитолиза клетки, экспрессирующей MICA. Фактически, MICA действует как сигнал «убей меня» для клеток во время стресса. MICA экспрессируется различными опухолевыми клетками.

[0059] Термин «MICA» включает любые варианты или изоформы MICA, которые экспрессируются клетками в природе, включая без ограничения опухолевые клетки. Следовательно, описанные в настоящем документе антитела могут перекрестно взаимодействовать с MICA видов, отличных от человека (например, MICA яванского макака). В качестве альтернативы, антитела могут быть специфическими отношении MICA человека и не проявлять какую-либо перекрестную реактивность с другими видами. MICA или любые его варианты и изоформы могут быть либо выделены из клеток или тканей, которые их экспрессируют в природе, либо могут быть получены рекомбинантным путем с

применением хорошо известных в данной области методик и/или методик, описанных в настоящем документе.

[0060] MICA человека (SEQ ID NO: 51) состоит из 332 аминокислот. Были идентифицированы по меньшей мере две дополнительные изоформы MICA человека. Изоформа 1, известная как MICA1 (UniProt ID № Q29983-1; SEQ ID NO: 109), состоит из 383 аминокислот. Изоформа 2, известная как MICA2 (UniProt ID № Q29983-2; SEQ ID NO: 88), состоит из 287 аминокислот. В MICA2 отсутствуют аминокислотные остатки 109-204, по сравнению с аминокислотной последовательностью MICA1.

[0061] Ниже приведены аминокислотные последовательности трех известных изоформ MICA человека.

(A) MICA человека (SEQ ID NO: 51):
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRY
 DRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEI
 RVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAM
 KTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYP
 RNIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGN
 HSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAGCCYFCYYYFLCPLL

(B) Изоформа 1 MICA человека (UniProt ID № Q29983-1; SEQ ID NO: 109):
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLTEVHLDGQPFLRC
 DRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE
 DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADC
 LQELRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQ
 QWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAA
 AAAAIFVIIIFYVRCCKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGS
 TEGA

(C) Изоформа 2 MICA человека (UniProt ID № Q29983-2; SEQ ID NO: 88):
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLTEVHLDGQPFLRC
 DRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEVPPMVNVTRSEASEG
 NITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCY
 MEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAIFVIIIFYVRCCKKTSAAEGPELVSLQ
 VLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA

[0062] Сигнальная последовательность MICA соответствует аминокислотам 1-23 (подчеркнуто). Таким образом, зрелые изоформы MICA, MICA1 и MICA2, состоят из аминокислот 24-332, 383 или 287 соответственно. Внеклеточный домен зрелого MICA

человека состоит из аминокислот 24-307 SEQ ID NO: 51 и имеет аминокислотную последовательность:

EPHSLRYNLTVLSDGSGVQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLTKIEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDNGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHW (SEQ ID NO: 89).

[0063] Существует ряд известных аллелей MICA (MICA). Согласно некоторым вариантам осуществления MICA представляет собой MICA*002 (также называемый в настоящем документе аллельным вариантом MICA*002), который имеет аминокислотную последовательность:

MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRCRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDNGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGT (SEQ ID NO: 110).

[0064] Согласно некоторым вариантам осуществления MICA представляет собой MICA*004 (также называемый в настоящем документе антигеном MICA*004), который имеет аминокислотную последовательность:

MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRRVPMMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLSTRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDNGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAIAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA (SEQ ID NO: 111).

[0065] Согласно некоторым вариантам осуществления MICA представляет собой MICA*008 (также называемый в настоящем документе антигеном MICA*008), который имеет аминокислотную последовательность:

MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTRQDGVSLSHDTQQWGDV

LPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI
FVIIIFYVRCC (SEQ ID NO: 112).

[0066] Согласно некоторым вариантам осуществления MICA представляет собой MICA*009 (также называемый в настоящем документе антигеном MICA*009), который имеет аминокислотную последовательность:

MGLGPVFLLLAGIFFPAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKC
RAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTR
SSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELR
RYLESSVVLRRTPPMNVNTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHDTQQWGDV
LPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI
FVIIIFYVRCCKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTGT
(SEQ ID NO: 113).

[0067] Согласно некоторым вариантам осуществления MICA представляет собой MICA*009 (также называемый в настоящем документе антигеном MICA*009), который имеет аминокислотную последовательность:

MGLGPVFLLLAGIFFPAPPGAAAEPHSLPYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKC
RAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTR
SSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELR
RYLESSVVLRRTPPMNVNTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWQRDGVSLSHDTQQWGDV
LPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAA
IFVIIIFYVRCCKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
(SEQ ID NO: 114).

[0068] Существует много разных аллелей MICA человека, известных в данной области, включая семьдесят три или более аллелей MICA. См. Frigoul and Lefranc, *Recent Res. Devel. Human Genet.* 3:95-145 (2005). Раскрытые в настоящем описании антитела могут связываться с одним или несколькими аллельными вариантами MICA. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к MICA/B специфически связываются с одним аллельным вариантом MICA. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к MICA/B связываются с высокой аффинностью с одним или несколькими аллельными вариантами MICA и с низкой аффинностью с другими аллельными вариантами MICA. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к MICA/B связываются с одним или несколькими аллельными вариантами MICA, выбранными из группы, состоящей из MICA*002, MICA*004, MICA*008 и MICA*009. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к MICA/B связываются с высокой аффинностью с MICA*004, MICA*008 и MICA*009 и необязательно с низкой аффинностью с MICA*002.

[0069] Белок MICA яванского макака содержит следующую аминокислотную последовательность (включая сигнальную последовательность):

ELHSLRYNVTVLSDGSGVQSGFLAEGHLDGQLFLLYDRQKCRARPQGEWSE
 LGAKTWDTTETGDLTENGKDLRMTLANHIKGGKGGHSLQEIKVCEIHEDNSTGGLRHFY
 YDGELFLSQNLETQEWTELQSSRAQTLALNIRNFWKEDTMKTKTHYRAVQADCLKKLQ
 QYLESQVAVRRRTAPPMVNVTHSEASEGNITVTCRASGFYPRNIALTWQDGVSLNHNA
 QQWGGILPDQNGTYQTWVATRIRQGEEQRFACYMEHSGNHSTHPVPS (SEQ ID NO: 90;
 UniProt ID № Q2MGE0).

[0070] MICB представляет собой экспрессируемый в природе гликозилированный и полиморфный белок, который обычно заякорен в клеточной мембране. Расщепление мембраносвязанного MICB приводит к высвобождению растворимой формы MICB во внеклеточный матрикс. MICB является лигандом NKG2D и действует как сигнал для индукции опосредованного NK- и Т-клетками цитолиза клетки, экспрессирующей MICB. MICB действует как сигнал «убей меня» для клеток во время стресса и экспрессируется различными опухолевыми клетками. Термин «MICB» включает любые варианты или изоформы MICB, которые экспрессируются клетками в природе, включая без ограничения опухолевые клетки.

[0071] Описанные в настоящем документе антитела могут перекрестно взаимодействовать с MICB видов, отличных от человека (например, MICB яванского макака). В качестве альтернативы, антитела могут быть специфическими отношении MICB человека и не проявлять какую-либо перекрестную реактивность с другими видами. MICB или любые его варианты и изоформы могут быть либо выделены из клеток или тканей, которые их экспрессируют в природе, либо могут быть получены рекомбинантным путем с применением хорошо известных в данной области методик и/или методик, описанных в настоящем документе.

[0072] MICB человека (SEQ ID NO: 132) состоит из 383 аминокислот (UniProt ID № Q29980), имея аминокислотную последовательность ниже:

MGLGRVLLFLAVAFPFAPPAAAAEPHSLRYNLMVLSQDESVQSGFLAEGHLDGQ
 PFLRYD
 RQKRRAKPQGQWAEDVLGAKTWDTTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKGGHSL
 QEIRVCE
 IHEDSSTRGSRHFYYDGELFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVTNFWKEDAM
 KTKTHY
 RAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRTVPPMVNVTCSEVSEGNITVTCRASSFYPRNI
 TLTWR

QDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGT
HPVPSGKV

LVLQSQRTDFPYVSAAMPCFVIIIILCVPCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGT
GDHR

DAAQLGFQPLMSATGSTGSTEGA

[0073] Были идентифицированы дополнительные изоформы MICB человека. Изоформа 2 MICB (UniProt ID № Q29980-2) имеет следующую аминокислотную последовательность:

MGLGRVLLFLAVAFPFAPPAAAAEPHSLRYNLMVLSQDESVQSGFLAEGHLDGQ
PFLRYD

RQKRRAKPQGQWAEDVLGAKTWDTEDELTENGQDLRRTLTHIKDQKGV PQSS
RAQTLAM

NVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRTVPPMVNVTCS
E VSEGNITV

TCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRIRQGE
EQRFTCY

MEHSGNHGTHPVPSGKVLVLQSQRTDFPYVSAAMPCFVIIIILCVPCCKKKTSAA
EGPEL

VSLQVLDQHPVGTGDHRDAAQLGFQPLMSATGSTGSTEGA (SEQ ID NO:133).

[0074] Согласно некоторым вариантам осуществления термин «антитело» относится к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (в настоящем документе сокращено как VH) и константной области тяжелой цепи (в настоящем документе сокращено как CH). В некоторых антителах, например, встречающихся в природе IgG-антителах, константная область тяжелой цепи состоит из шарнира и трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В некоторых антителах, например, встречающихся в природе IgG-антителах, каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (в настоящем документе сокращено как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (в настоящем документе сокращено как CL). VH- и VL-области дополнительно могут быть разделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области

тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки), и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Тяжелая цепь может содержать С-концевой лизин, или может не содержать его. Если в настоящем документе не указано иное, аминокислоты в переменных областях нумеруются с применением системы нумерации по Kabat, а аминокислоты в константных областях нумеруются с применением системы EU.

[0075] В контексте настоящего документа «IgG-антитело», например, IgG1-, IgG2-, IgG3- и IgG4-антитело человека, согласно некоторым вариантам осуществления, имеет структуру встречающегося в природе IgG-антитела, т. е. оно имеет такое же число тяжелых и легких цепей и дисульфидных связей, что и встречающееся в природе IgG-антитело того же подкласса. Например, IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-антитело к MICA/B состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), причем две HC и LC соединены посредством одинакового числа дисульфидных мостиков, и в том же их местоположении, что и в случае встречающихся в природе IgG1-, IgG2-, IgG3- и IgG4-антител соответственно (если только антитело не было подвергнуто мутации с целью модификации дисульфидных мостиков).

[0076] Антитела, как правило, связываются специфически с их когнатным антигеном с высокой аффинностью, на что указывает константа диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-11} М или меньше. В целом считается, что любая K_D , превышающая приблизительно 10^{-4} М, указывает на неспецифическое связывание. В контексте настоящего документа антитело, которое «специфически связывается» с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и в значительной степени идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает наличие K_D 10^{-7} М или меньше, 10^{-8} М или меньше, 5×10^{-9} М или меньше или от 10^{-8} М до 10^{-10} М или меньше, но при этом не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является «в значительной степени идентичным» данному антигену, если он характеризуется высокой степенью идентичности последовательности с данным антигеном, например, если он характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с последовательностью данного антигена. В качестве примера, антитело, которое специфически связывается с MICA/B человека, может, согласно некоторым вариантам осуществления, также характеризоваться перекрестной реактивностью с антигенами MICA/B определенных видов приматов (например, MICA/B яванского макака), но могут не реагировать перекрестно с антигенами MICA/B других видов или с антигеном, отличным от MICA/B.

[0077] Иммуноглобулин может относиться к любому из общеизвестных изотипов, включая без ограничения IgA, секреторные IgA, IgG и IgM. Изотип IgG у некоторых видов разделен на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МСА/В относятся к подтипу IgG1. Иммуноглобулины, например, IgG1, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем на несколько аминокислот. «Антитело» включает, в качестве примера, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и отличные от человеческих антитела и полностью синтетические антитела.

[0078] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела в контексте настоящего документа относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, МСА/В человека). Было показано, что функция антитела, заключающаяся в связывании антигена, может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином «антигенсвязывающая часть» антитела, например, описанного в настоящем документе антитела к МСА/В, включают (i) Fab-фрагмент (образующийся при расщеплении папаином фрагмент) или аналогичный одновалентный фрагмент, состоящий из V_L-, V_H-, CL- и CH1-доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент (образующийся при расщеплении пепсином фрагмент) или аналогичный двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L- и V_H-доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из V_H-домена; (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) и (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, с применением рекомбинантных способов, синтетическим линкером, который позволяет получать их в виде одной белковой цепи, в которой V_L- и V_H-области объединяются в пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охвачены термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Такие фрагменты антител получают с применением известных специалистам в данной области традиционных методик, и фрагменты подвергают скринингу на предмет

полезности аналогичным образом, что и в случае интактных антител. Антигенсвязывающие части могут быть получены с помощью методик рекомбинантных ДНК или с помощью ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

[0079] «Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело с двумя разными парами тяжелых/легких цепей и двумя разными центрами связывания. Биспецифические антитела могут быть получены с помощью ряда способов, включая слияние с получением гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

[0080] Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу из популяции в значительной степени гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются в значительной степени подобными и связывают один(одни) и тот(те) же эпитоп(эпитопы) (например, антитела характеризуются одной специфичностью связывания и аффинностью), за исключением возможных вариантов, которые могут образовываться в ходе получения моноклонального антитела, при этом такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. Модификатор «моноклональный» указывает на характеристику антитела, состоящую в том, что оно было получено из в значительной степени гомогенной популяция антител, и не должен толковаться как предусматривающий необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Термин «моноклональное антитело человека» относится к антителу из популяции в значительной степени гомогенных антител, которые характеризуются одной специфичностью связывания и которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональные антитела человека получают с помощью гибридомы, которая содержит В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, с геномом, предусматривающим трансген, кодирующий тяжелую цепь, и трансген, кодирующий легкую цепь человека, слитую с бессмертной клеткой.

[0081] В контексте настоящего документа термин «рекомбинантное антитело человека» включает все антитела человека, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как (а) антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулинов человека, или гибридомы, полученной с его применением, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для

экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью других способов, которые включают объединение последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, в которых используются конкретные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но предусматривают последующие перестройки и мутации, которые происходят, например, в процессе созревания антитела. Как известно в данной области (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые перестраиваются с образованием антитела, специфического в отношении чужеродного антигена. Помимо перестройки, переменная область дополнительно может быть модифицирована за счет множества изменений по одной аминокислоте (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для повышения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константная область будет меняться при дальнейшем ответе на антиген (т. е. при переключении изотипа). Следовательно, перестроенные и подверженные соматической мутации молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не характеризоваться идентичностью последовательностей с исходными молекулами нуклеиновых кислот, но вместо этого будут в значительной степени идентичными или подобными (т. е. характеризоваться по меньшей мере 80% идентичностью).

[0082] Антитело «человека» (HuMAb) относится к антителу, содержащему переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, в случае мутаций, введенных с применением случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «антитело человека» не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, были привиты на каркасные

последовательности человека. Термины антитела «человека» и «полностью человеческие» антитела применяют как синонимы.

[0083] «Гуманизированное» антитело относится к антителу, в котором некоторые, большая часть или все из аминокислот вне CDR-доменов антитела, не являющегося антителом человека, замещены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большая часть или все из аминокислот вне CDR-доменов были замещены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большая часть или все из аминокислот в пределах одной или нескольких CDR-областей остались неизменными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, при условии, что они не устраняют способность антитела связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой исходного антитела.

[0084] «Химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области происходят из одного вида, а константные области происходят из другого вида, как, например, антитело, в котором переменные области происходят из антитела мыши, а константные области происходят из антитела человека.

[0085] В контексте настоящего документа «изотип» относится к классу антитела (например, антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

[0086] «Аллотип» относится к встречающимся в природе вариантам в пределах конкретной изотипической группы, причем варианты отличаются по нескольким аминокислотам (см., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1). Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут относиться к любому аллотипу. В контексте настоящего документа антитела, обозначенные как изотип «IgG1f», «IgG1.1f» или «IgG1.3f», представляют собой IgG1-, лишенные эффекторной функции IgG1.1 и лишенные эффекторной функции IgG1.3-антитела соответственно аллотипа «f», т. е. имеющие 214R, 356E и 358M в соответствии с EU-индексом по Kabat.

[0087] Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфическое в отношении антигена» в настоящем документе применяют взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

[0088] Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое практически не содержит других белков и клеточного материала.

[0089] Подразумевается, что в контексте настоящего документа антитело, которое «связывает МІСА/В», относится к антителу, которое взаимодействует с МІСА/В, например, в анализах связывания с применением клеток СНО, трансфицированных МІСА/В или МІСА/В человека, экспрессируемыми опухолевыми клетками, с EC_{50} приблизительно 25 мкг/мл или меньше, приблизительно 23 мкг/мл или меньше, приблизительно 20 мкг/мл или меньше, приблизительно 15 мкг/мл или меньше, приблизительно 10 мкг/мл или меньше, приблизительно 5 мкг/мл или меньше, приблизительно 3 мкг/мл или меньше, приблизительно 2 мкг/мл или меньше, приблизительно 1 мкг/мл или меньше, приблизительно 0,5 мкг/мл или меньше, приблизительно 0,45 мкг/мл или меньше, приблизительно 0,4 мкг/мл или меньше, приблизительно 0,35 мкг/мл или меньше или приблизительно 0,3 мкг/мл или меньше в известных в данной области способах, например, описанных в настоящем документе анализах связывания на основе FACS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый на поверхности, например, клеток СНО, с EC_{50} приблизительно 200 нМ или меньше, приблизительно 175 нМ или меньше, приблизительно 160 нМ или меньше, приблизительно 150 нМ или меньше, приблизительно 125 нМ или меньше, приблизительно 110 нМ или меньше, приблизительно 100 нМ или меньше, приблизительно 80 нМ или меньше, приблизительно 75 нМ или меньше, приблизительно 60 нМ или меньше, приблизительно 50 нМ или меньше, приблизительно 40 нМ или меньше, приблизительно 35 нМ или меньше, приблизительно 30 нМ или меньше, приблизительно 25 нМ или меньше, приблизительно 20 нМ или меньше, приблизительно 15 нМ или меньше, приблизительно 10 нМ или меньше, приблизительно 9 нМ или меньше, приблизительно 8 нМ или меньше, приблизительно 7 нМ или меньше, приблизительно 6 нМ или меньше, приблизительно 5 нМ или меньше, приблизительно 4 нМ или меньше, приблизительно 3 нМ или меньше, приблизительно 2 нМ или меньше, приблизительно 1,9 нМ или меньше, приблизительно 1,8 нМ или меньше, приблизительно 1,7 нМ или меньше, приблизительно 1,6 нМ или меньше, приблизительно 1,5 нМ или меньше, приблизительно 1,4 нМ или меньше, приблизительно 1,3 нМ или меньше, приблизительно 1,2 нМ или меньше, приблизительно 1,1 нМ или меньше, приблизительно 1,0 нМ или меньше, приблизительно 0,9 нМ или меньше, приблизительно 0,8 нМ или меньше, приблизительно 0,7 нМ или меньше, приблизительно 0,6 нМ или меньше, приблизительно 0,5 нМ или меньше, приблизительно 0,4 нМ или меньше, приблизительно 0,3 нМ или меньше, приблизительно 0,2 нМ или меньше или приблизительно 0,1 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} менее чем

приблизительно 10 нМ. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} менее чем приблизительно 5 нМ. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} менее чем приблизительно 1,5 нМ. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} приблизительно 1 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} приблизительно 0,5 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} приблизительно 0,3 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА/В человека, экспрессируемый, например, на поверхности клеток СНО, с EC_{50} приблизительно 0,2 нМ или меньше.

[0090] Подразумевается, что в контексте настоящего документа антитело, которое «ингибирует, предупреждает или снижает сбрасывание МІСА/В» клеткой, например, опухолевой клеткой, относится к антителу, которое ингибирует, предупреждает или снижает высвобождение растворимого МІСА/В из поверхности клетки. Не вдаваясь в подробности механизма, раскрытые в настоящем документе антитела к МІСА/В обеспечивают снижение количества МІСА/В, который высвобождается, например, путем отщепления, в плазму крови в виде растворимого МІСА/В. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело обеспечивает повышение мембраносвязанного МІСА/В на поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В обеспечивает повышение сохранения поверхностного МІСА/В на поверхности клетки, трансфицированной МІСА/В человека, с EC_{50} для сохранения МІСА/В приблизительно 10 нМ или меньше, приблизительно 5 нМ или меньше, приблизительно 1 нМ или меньше, приблизительно 0,85 нМ или меньше, приблизительно 0,8 нМ или меньше, приблизительно 0,75 нМ или меньше, приблизительно 0,7 нМ или меньше, приблизительно 0,65 нМ или меньше, приблизительно 0,6 нМ или меньше, приблизительно 0,55 нМ или меньше, приблизительно 0,5 нМ или меньше, приблизительно 0,45 нМ или меньше, приблизительно 0,4 нМ или меньше, приблизительно 0,35 нМ или меньше, приблизительно 0,3 нМ или меньше, приблизительно 0,25 нМ или меньше, приблизительно 0,2 нМ или меньше, приблизительно 0,15 нМ или меньше или приблизительно 0,1 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В обеспечивает повышение

сохранения поверхностного МІСА/В на поверхности клетки, трансфицированной МІСА/В человека, по меньшей мере в приблизительно 1,2 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,3 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,4 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,6 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,7 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,8 раза, по меньшей мере в приблизительно 1,9 раза, по меньшей мере в приблизительно 2 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,1 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,2 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,3 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,4 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 2,75 раза, по меньшей мере в приблизительно 3 раза, по меньшей мере в приблизительно 3,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 4 раза, по меньшей мере в приблизительно 4,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 5 раз, по меньшей мере в приблизительно 7,5 раза, по меньшей мере в приблизительно 10 раз или по меньшей мере в приблизительно 20 раз.

[0091] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В обеспечивает снижение уровней растворимого МІСА/В (sMICA/B) в сыворотке крови пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В обеспечивает снижение уровня растворимого МІСА/В, сбрасываемого с клеток, трансфицированных МІСА/В человека, с IC_{50} приблизительно 10 нМ или меньше, приблизительно 5 нМ или меньше, приблизительно 1 нМ или меньше, приблизительно 0,7 нМ или меньше, приблизительно 0,6 нМ или меньше, приблизительно 0,5 нМ или меньше, приблизительно 0,45 нМ или меньше, приблизительно 0,4 нМ или меньше, приблизительно 0,35 нМ или меньше, приблизительно 0,3 нМ или меньше, приблизительно 0,25 нМ или меньше, приблизительно 0,2 нМ или меньше, приблизительно 0,19 нМ или меньше, приблизительно 0,18 нМ или меньше, приблизительно 0,17 нМ или меньше, приблизительно 0,16 нМ или меньше, приблизительно 0,15 нМ или меньше, приблизительно 0,14 нМ или меньше, приблизительно 0,13 нМ или меньше, приблизительно 0,12 нМ или меньше, приблизительно 0,11 нМ или меньше, приблизительно 0,1 нМ или меньше, приблизительно 0,09 нМ или меньше, приблизительно 0,08 нМ или меньше, приблизительно 0,07 нМ или меньше, приблизительно 0,06 нМ или меньше, приблизительно 0,05 нМ или меньше, приблизительно 0,04 нМ или меньше, приблизительно 0,03 нМ или меньше, приблизительно 0,02 нМ или меньше или приблизительно 0,01 нМ или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В обеспечивает снижение сбрасывания МІСА/В с клеток, трансфицированных МІСА человека, в приблизительно 0,9 раза или меньше, в приблизительно 0,85 раза или меньше, в приблизительно 0,8 раза или меньше, в приблизительно 0,75 раза или меньше, в приблизительно 0,7 раза или

меньше, в приблизительно 0,65 раза или меньше, в приблизительно 0,6 раза или меньше, в приблизительно 0,55 раза или меньше, в приблизительно 0,5 раза или меньше, в приблизительно 0,45 раза или меньше, в приблизительно 0,4 раза или меньше, в приблизительно 0,35 раза или меньше, в приблизительно 0,3 раза или меньше, в приблизительно 0,25 раза или меньше, в приблизительно 0,2 раза или меньше, в приблизительно 0,15 раза или меньше, в приблизительно 0,1 раза или меньше или в приблизительно 0,05 раза или меньше. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B может обеспечивать снижения уровней растворимого MICA/B в сыворотке крови субъекта, например, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80% или по меньшей мере на приблизительно 90%.

[0092] Термин «сбрасываемый» или «сбрасывание» в контексте настоящего документа относится к высвобождению растворимого MICA/B из поверхности экспрессирующей MICA/B клетки. MICA/B экспрессируется в виде трансмембранного белка, который находится на поверхности клетки. Расщепление в пределах внеклеточного домена приводит к высвобождению части MICA/B в плазму крови, который в настоящем документе называется «растворимым MICA/B» или «sMICA/B».

[0093] «Эффекторная функция» относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом, или биохимическому событию, которое является результатом этого. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP), и отрицательную регуляцию рецептора клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR). Для обеспечения таких эффекторных функций обычно требуется объединение Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела).

[0094] «Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с IgG-антителом, предусматривают рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и образованные в результате альтернативного сплайсинга формы таких рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства FcγR человека известны в данной области. Большинство типов эффекторных клеток

врожденного иммунитета коэкспрессируют один или несколько активирующих $Fc\gamma R$ и ингибирующий $Fc\gamma RIIb$, тогда как естественные клетки-киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор ($Fc\gamma RIII$ у мышей и $Fc\gamma RIIIA$ у людей), но не ингибирующий $Fc\gamma RIIb$ у мышей и людей. IgG1 человека связывается с большинством Fc-рецепторов человека и считается эквивалентным IgG2a мыши в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

[0095] «Fc-область» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), или «Fc-домен», или «Fc» относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, расположенными на поверхности ряда клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области (например, CH1 или CL). У антител изотипов IgG, IgA и IgD Fc-область содержит два идентичных белковых фрагмента, происходящих из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (CH-домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG, Fc-область содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между CH1- и CH2-доменами. Хотя определение границ Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина может варьироваться, как определено в настоящем документе, Fc-область тяжелой цепи IgG человека определена отрезком от аминокислотного остатка D221 для IgG1, V222 для IgG2, L221 для IgG3 и P224 для IgG4 до карбокси-конца тяжелой цепи, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом по Kabat. CH2-домен Fc-области IgG человека простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, а CH3-домен расположен с C-концевой стороны CH2-домена в Fc-области, т. е. он простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447, или 446 (если C-концевой лизинный остаток отсутствует), или 445 (если C-концевые глициновый и лизинный остатки отсутствуют) IgG. В контексте настоящего документа Fc-область может представлять собой Fc с нативной последовательностью, включая любой аллотипический вариант или вариантную Fc (например, не встречающуюся в природе Fc).

[0096] «Fc-область с нативной последовательностью» или «Fc с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, обнаруживаемой в природе. Fc-области человека с нативными последовательностями включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG2 человека с нативной

последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью; и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты. Fc с нативной последовательностью предусматривают различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1: 1).

[0097] Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене (например, MICA), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело, например, как определено с помощью конкретного способа, применяемого для его идентификации. Эпитопы могут быть образованы как непрерывными аминокислотами (как правило, линейный эпитоп), так и прерывающимися аминокислотами, расположенными рядом благодаря укладке белка в третичную структуру (как правило, конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из непрерывных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря укладке в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связываются данным антителом (т. е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области и включают, например, анализы на основе иммуноблоттинга и иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из MICA) тестируют в отношении реактивности с данным антителом (например, антителом к MICA/B). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики из уровня техники и методики, описанные в настоящем документе, например, рентгеноструктурный анализ, рентгеноструктурный анализ комплексов, мутационный анализ антигенов, 2-мерную ядерную магнитно-резонансную спектроскопию и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0098] Термин «картирование эпитопов» относится к процессу идентификации молекулярных детерминант для распознавания антитело-антиген.

[0099] Выражение «связывается с одним и тем же эпитопом» применительно к двум или более антителам означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом из аминокислотных остатков, как определяют с помощью данного способа. Методики определения того, связываются ли антитела с «одним и тем же эпитопом на MICA» с применением описанных в настоящем документе антител включают, например, способы картирования эпитопов, как, например, с использованием рентгеноструктурного анализа кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение для

эпитопа, и масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Другие способы позволяют отслеживать связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, в которых отсутствие связывания вследствие модификации по аминокислотному остатку в пределах последовательности антигена обычно считается признаком наличия компонента, являющегося эпитопом. Кроме того, также можно применять вычислительные комбинаторные способы картирования эпитопов. Такие способы основываются на способности представляющего интерес антитела обеспечивать аффинное выделение конкретных коротких пептидов из комбинаторных библиотек пептидов, полученных с применением фагового дисплея. Ожидается, что антитела с одинаковыми VH и VL или одинаковыми последовательностями CDR1, 2 и 3 связываются с одним и тем же эпитопом.

[0100] Антитела, которые «конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью» относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т. е. ингибирует ли одно антитело, и до какой степени, связывание другого антитела с мишенью, можно определять с применением известных экспериментов по конкурированию, например, анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE[®]. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может различаться в зависимости от того, какое антитело является «блокирующим антителом» (т. е. холодное антитело, которое инкубируют с мишенью первым). Анализы конкуренции можно проводить как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Два антитела «перекрестно конкурируют», если антитела блокируют друг друга в обоих направлениях по меньшей мере на 50%, то есть независимо от того, какое из антител первым контактирует с антигеном в эксперименте по конкуренции.

[0101] Конкурентные анализы связывания для определения того, конкурируют ли два антитела или перекрестно конкурируют за связывание, включают: анализ конкуренции за связывание с клетками, экспрессирующими MICA/B, например, с использованием проточной цитометрии, как, например, описанный в Примерах. Другие способы включают: SPR (например, BIACORE[®]), твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), сэндвич-анализ конкуренции (см. Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983));

твердофазный прямой EIA с системой биотин-авидин (см. Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с применением мечения, твердофазный прямой сэндвич-анализ с применением мечения (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой RIA с применением мечения с использованием метки 1-125 (см. Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA с системой биотин-авидин (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); и прямой RIA с применением мечения. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

[0102] В контексте настоящего документа термины «специфическое связывание», «избирательное связывание», «избирательно связывает» и «специфически связывает» относятся к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) примерно менее 10^{-7} М, как, например, примерно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже меньше при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore® 2000 с применением заданного антигена, например, рекомбинантного МІСА или МІСВ человека, в качестве анализируемого вещества, и антитела в качестве лиганда, или анализа по Скэтчарду связывания антитела с антиген-положительными клетками, и (ii) связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность в случае связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена, или близкородственным антигеном. Следовательно, антитело, которое «специфически связывается с МІСА/В человека», относится к антителу, которое связывается с растворимым или клеточносвязанным МІСА/В человека с K_D 10^{-7} М или меньше, как, например, примерно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже меньше. Антитело, которое «перекрестно реагирует с МІСА/В яванского макака», относится к антителу, которое связывается с МІСА/В яванского макака с K_D 10^{-7} М или меньше, как, например, примерно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела, которые не реагируют перекрестно с МІСА/В вида, отличного от человека, характеризуются в основном невыявляемым связыванием в отношении таких белков в стандартных анализах связывания.

[0103] Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин « $k_{\text{ассоц.}}$ » или « k_a » относится к скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин « $k_{\text{диссоц.}}$ » или « k_d », как подразумевается в контексте настоящего документа, относится к скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин « K_D » относится

к константе диссоциации, получаемой из отношения k_d к k_a (т. е. k_d/k_a), и выражаемой в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определять с применением способов, устоявшихся в данной области. Доступные способы определения K_D антитела включают метод поверхностного плазмонного резонанса, способ с использованием биосенсорной системы, такой как система BIACORE®, или проточную цитометрию и анализ по Скэтчарду.

[0104] В контексте настоящего документа термин «высокоаффинный» по отношению к IgG-антителу относится к антителу, характеризующемуся K_D 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М или меньше или 10^{-10} М или меньше в отношении целевого антигена. Однако «высокоаффинное» связывание может варьировать для других изотипов антител. Например, «высокоаффинное» связывание для изотипа IgM относится к антителу, характеризующемуся K_D 10^{-10} М или меньше или 10^{-8} М или меньше.

[0105] Термин «EC₅₀» в контексте *in vitro* или *in vivo* анализа с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т. е. срединный между максимальным ответом и исходным уровнем.

[0106] В контексте настоящего документа термин «встречающийся в природе», применительно к объекту, относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которые находятся в организме (в том числе вирусах), которые могут быть выделены из источника в природе, и которые не были намеренно модифицированы человеком в лаборатории, являются встречающимися в природе.

[0107] «Полипептид» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно соединенных аминокислотных остатка, без максимального ограничения по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут предусматривать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи. «Белок» может предусматривать один или несколько полипептидов.

[0108] Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «молекула нуклеиновой кислоты» включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одонитевой или двунитевой, и может представлять собой кДНК.

[0109] «Консервативные аминокислотные замены» относятся к заменам аминокислотного остатка аминокислотным остатком с подобной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с подобными боковыми цепями были определены в

данной области. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Согласно некоторым вариантам осуществления предполагаемый заменимый аминокислотный остаток в антителе к MICA/B замещают другим аминокислотным остатком из семейства с аналогичной боковой цепью. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не обуславливают устранение связывания с антигеном, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0110] В случае нуклеиновых кислот термин «значительная степень гомологии» указывает на то, что две нуклеиновые кислоты, или их обозначенные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении, являются идентичными, с учетом соответствующих вставок или делеций нуклеотидов, по меньшей мере по приблизительно 80% нуклеотидам, по меньшей мере по приблизительно 90%-95% или по меньшей мере по приблизительно 98%-99,5% нуклеотидам. В качестве альтернативы, значительная степень гомологии имеет место в том случае, когда сегменты будут гибридизироваться с комплементарной нитью в условиях избирательной гибридизации.

[0111] В случае полипептидов термин «значительная степень гомологии» указывает на то, что два полипептида, или их обозначенные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении, являются идентичными, с учетом соответствующих вставок или делеций аминокислот, по меньшей мере по приблизительно 80% аминокислотам, по меньшей мере по приблизительно 90%-95% или по меньшей мере по приблизительно 98%-99,5% аминокислотам.

[0112] Процентная идентичность для двух последовательностей является функцией от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. % гомологии = № идентичных положений/общее № положений $\times$ 100), с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые требуется ввести для осуществления оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности для двух последовательностей можно осуществлять с применением математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

[0113] Процентную идентичность для двух нуклеотидных последовательностей можно определять с применением программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступно на сайте worldwideweb.gcg.com), с применением матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентную идентичность для двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей также можно определять с применением алгоритма Миллера–Маерса (E. Meyers and W. Miller) (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версии 2.0), с применением таблицы весов аминокислотных замен PAM120, штрафа за продление гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, процентную идентичность для двух аминокислотных последовательностей можно определять с применением алгоритма Нидлмана–Вунша (Needleman and Wunsch) (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступно на сайте <http://www.gcg.com>), с применением либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0114] Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновых кислот и белков дополнительно можно применять в качестве «заданной последовательности» для выполнения поиска по общедоступным базам данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с применением программ NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиски нуклеотидных последовательностей с помощью BLAST можно выполнять с применением программы NBLAST, вес выравнивания = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанным в настоящем документе. Поиски белковых последовательностей с помощью BLAST можно выполнять с применением программы XBLAST, вес выравнивания = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков, описанным в настоящем документе. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov.

[0115] Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «оказывается практически чистой» при очистке от других

клеточных компонентов или других контаминирующих веществ, например, других нуклеиновых кислот клетки (например, других частей хромосомы) или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочью/SDS, CsCl-бэ́ндинг, хроматографию на колонке, электрофорез в агарозном геле и другие хорошо известные в данной области методики. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0116] Нуклеиновые кислоты, например, кДНК, можно подвергать мутации в соответствии со стандартными методиками с получением последовательностей генов. Для кодирующих последовательностей такие мутации, при необходимости, могут затрагивать аминокислотную последовательность. В частности, предполагаются последовательности ДНК, в значительной степени гомологичные или происходящие из нативных V, D, J, константных, отвечающих за переключение класса и других таких последовательностей, описанных в настоящем документе (когда «происходящий» указывает на то, что последовательность является идентичной или модифицированной по сравнению с другой последовательностью).

[0117] Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой он был соединен. Одним из типов векторов является «плазмида», которая относится к кольцевой двунитевой ДНК-петле, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят, (например, векторы для экспрессии в бактериях, характеризующиеся бактериальным типом репликации, и эписомные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих). Другие векторы (например, отличные от эписомных векторов для экспрессии в клетках млекопитающих) после введения в клетку-хозяина могут интегрироваться в геном клетки-хозяина, и, следовательно, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называются «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). В целом векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантных ДНК, зачастую находятся в форме плазмид. В настоящем описании термины «плазмида» и «вектор» можно применять взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто применяемой формой вектора. Однако также включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные

векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[0118] Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях отсутствует в клетке, и может представлять собой клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что подразумевается, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но и к потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды могут происходить определенные модификации, такое потомство может не быть, по сути, идентичным родительской клетке, но в контексте настоящего документа оно все еще включено в объем термина «клетка-хозяин».

[0119] Термин «иммунный ответ» имеет значение, стандартное для данной области, и обычно относится к биологическому ответу у позвоночного на чужеродные агенты или аномальные, например, раковые клетки, причем указанный ответ защищает организм от таких агентов и от возникновения вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, продуцируемыми любыми из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и белки системы комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунной реакции или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4⁺ клетки, CD8⁺ Т-клетки или клетки Treg, или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, например, NK-клетки.

[0120] «Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к средству, например, средству, нацеленному на компонент сигнального пути, который может быть вовлечен в модулирование, регулирование или модифицирование иммунного ответа. «Модулирование», «регулирование» или «модифицирование» иммунного ответа относится к любому изменению по отношению к клетке иммунной системы или активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки, такой как Th1-клетка). Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, которые могут проявляться в

увеличении или уменьшении числа различных типов клеток, повышении или снижении активности таких клеток или любых других изменениях, которые могут иметь место в рамках иммунной системы. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут характеризоваться усиленной функцией в микроокружении опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуномодулятор нацелен на молекулу на поверхности Т-клетки. «Иммуномодулятор-мишень» или «иммунорегулятор-мишень» представляет собой молекулу, например, молекулу клеточной поверхности, которая является мишенью для связывания, и активность которой изменяется при связывании веществом, средством, группой, соединением или молекулой. Иммуномодуляторы-мишени включают, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодулирующие рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодулирующие лиганды»).

[0121] «Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего от заболевания, или подверженного риску развития или перенесения рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индуцирование, усиление, подавление или какое-либо другое модифицирование в отношении иммунной системы или иммунного ответа.

[0122] «Иммуностимулирующая терапия» или «иммуностимуляторная терапия» относится к терапии, которая приводит к повышению в отношении (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, для лечения злокачественной опухоли.

[0123] «Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или активности имеющегося иммунного ответа у субъекта. Повышение эффективности и активности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые опосредуют подавление иммунного ответа хозяина, или путем стимулирования механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

[0124] «Т-эффекторные» («T_{eff}») клетки относятся к Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также Т-хелперным (Th) клеткам, например, Th1-клеткам, при этом такие клетки секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают регуляторные Т-клетки (клетки Treg). Определенные описанные в настоящем документе антитела к MICA/B активируют клетки T_{eff}, например, CD4⁺ и CD8⁺ клетки T_{eff} и Th1-клетки.

[0125] Усиленная способность к стимуляции иммунного ответа или иммунной системы может быть обусловлена усиленной агонистической активностью костимулирующих рецепторов Т-клетки и/или усиленной антагонистической активностью ингибирующих рецепторов. Об усиленной способности к стимуляции иммунного ответа или иммунной системы может свидетельствовать кратное повышение EC₅₀ или

максимальный уровень активности в анализе, с помощью которого измеряют иммунный ответ, например, анализе, с помощью которого измеряют изменения в отношении высвобождения цитокинов или хемокинов, цитолитической активности (определенной непосредственно в отношении целевых клеток или опосредованно путем выявления CD107a или гранзимов) и пролиферации. Способность к стимуляции иммунного ответа или активности иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или больше.

[0126] В контексте настоящего документа термин «связанный» относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может иметь место на уровне гена (т. е. при рекомбинантном слиянии). Такие связи могут быть обеспечены с применением широкого ряда известных в данной области методик, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантного белка.

[0127] В контексте настоящего документа «введение» относится к физическому введению субъекту содержащей терапевтическое средство композиции с применением любого из ряда способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Разные пути введения для описанных в настоящем документе антител к MICA/B включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в контексте настоящего документа означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. В качестве альтернативы, описанное в настоящем документе антитело можно вводить путем, отличным от парентерального, как, например, посредством местного, эпидермального или мукозального пути введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

[0128] В контексте настоящего документа термин «Т-клеточно-опосредованный ответ» относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки (например, CD8⁺ клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4⁺ клетки). Т-клеточно-

опосредованные ответы включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

[0129] В контексте настоящего документа термин «опосредованный цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) ответ» относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. CTL-ответы опосредованы в основном CD8⁺ Т-клетками.

[0130] В контексте настоящего документа фраза «ингибирует рост» опухоли включает любое измеряемое уменьшение в отношении роста опухоли, например, ингибирование роста опухоли по меньшей мере на приблизительно 10%, например, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 99% или 100%. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирование роста опухоли измеряется в виде ингибирования роста опухоли в процентах (TGI%). TGI% можно определять с помощью расчета TGI по данным «t», рассчитываемого для всех обрабатываемых животных в соответствии со следующей формулой: $[1 - ((T_t/T_0)/(C_t/C_0))]/[(C_t - C_0)/C_t] * 100$ [формула 1], где T_t = отдельный размер опухоли обработанного животного в момент времени «t», T₀ = отдельный размер опухоли обработанного животного на момент первого измерения, C_t = медианный размер опухоли контрольных животных в момент времени «t», C₀ = медианный размер опухоли контрольных животных на момент первого измерения.

[0131] В контексте настоящего документа «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Неконтролируемое деление клеток может приводить к образованию злокачественных новообразований или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут давать метастазы в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровяное русло.

[0132] Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» в контексте настоящего документа относятся к любому типу воздействия или процесса, осуществляемых по отношению к субъекту, или введению ему активного средства, с целью реверсии, ослабления, облегчения, ингибирования или замедления или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием, или повышения общей

выживаемости. Лечить можно субъекта, у которого наблюдают заболевание, или субъекта, у которого не наблюдают заболевание (например, для профилактики).

[0133] Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определен как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое, при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, повышение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, повышению общей выживаемости (промежуток времени либо с даты постановки диагноза, либо с момента начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого пациенты, у которых диагностировано заболевание, все еще остаются живы), или предупреждению ухудшения или утраты дееспособности вследствие поражения заболеванием. Терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства включает «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективную дозировку», которые представляют собой любое количество лекарственного средства, которое, при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или перенесения рецидива заболевания, обеспечивает ингибирование развития или рецидива заболевания. Способность терапевтического средства способствовать регрессии заболевания или ингибированию развития или рецидива заболевания можно оценивать с применением ряда способов, известных практикующему специалисту, например, у субъектов-людей в ходе клинических испытаний, в рамках систем с использованием модельных животных, с возможностью прогнозирования эффективности у людей, или с помощью анализа активности средства в *in vitro* анализах.

[0134] В качестве примера, противоопухолевое средство представляет собой лекарственное средство, которое способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства стимулирует регрессию рака до момента устранения рака. «Способствование регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с антинеопластическим средством, приводит к уменьшению темпа роста опухоли или ее размера, степени некроза опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, повышению общей

выживаемости, предупреждению ухудшения или утраты дееспособности вследствие поражения заболеванием или другому облегчению симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства стимулировать регрессию рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или других нежелательных физиологических эффектов на уровне клетки, органа и/или организма (нежелательные эффекты), обусловленных введением лекарственного средства.

[0135] В качестве примера лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства ингибирует клеточный рост или рост опухоли по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 60% или по меньшей мере на приблизительно 80%, по сравнению с показателями у субъектов, не получавших лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует клеточный рост или рост опухоли, т. е. ингибирует клеточный рост или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценивать с применением описанных ниже анализов. В качестве альтернативы, такое свойство композиции можно оценивать путем изучения способности соединения ингибировать клеточный рост, и такое ингибирование можно измерять *in vitro* с помощью известных практикующему специалисту анализов. Согласно некоторым вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, регрессия опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 20 дней, по меньшей мере приблизительно 40 дней или по меньшей мере приблизительно 60 дней.

[0136] Термин «пациент» включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0137] В контексте настоящего документа термин «субъект» включает любое животное, являющееся человеком, или не являющееся человеком. Например, описанные в настоящем документе способы и композиции можно применять для лечения субъекта, у которого наблюдается рак. Выражение «животное, не являющееся человеком» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии, рептилии и т. д.

[0138] Термин доза или дозировка, «рассчитанные на вес», как изложено в настоящем документе, означает, что вводимую пациенту дозу рассчитывают на основе веса

пациента. Например, если пациент с весом тела 60 кг нуждается в 3 мг/кг антитела к МІСА/В, можно рассчитать и применять соответствующее количество антитела к МІСА/В (т. е. 180 мг) для введения.

[0139] Использование термина «фиксированная доза» по отношению к описанным в настоящем документе комбинациям означает, что два или более разных антител (например, антитело к МІСА/В и второе антитело, например, антитело к PD-1 или PD-L1) присутствуют в композиции или вводятся отдельно в конкретных (фиксированных) количествах или соотношениях одного и другого. Согласно некоторым вариантам осуществления фиксированная доза рассчитана исходя из веса (например, мг) антител. Согласно некоторым вариантам осуществления фиксированная доза рассчитана исходя из концентрации (например, мг/мл) антител. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение двух антител (например, к МІСА/В и к PD1 или PD-L1), в виде соотношения мг первого антитела (например, антитела к МІСА/В) и мг второго антитела, составляет по меньшей мере приблизительно 1:1, приблизительно 1:2, приблизительно 1:3, приблизительно 1:4, приблизительно 1:5, приблизительно 1:6, приблизительно 1:7, приблизительно 1:8, приблизительно 1:9, приблизительно 1:10, приблизительно 1:15, приблизительно 1:20, приблизительно 1:30, приблизительно 1:40, приблизительно 1:50, приблизительно 1:60, приблизительно 1:70, приблизительно 1:80, приблизительно 1:90, приблизительно 1:100, приблизительно 1:120, приблизительно 1:140, приблизительно 1:160, приблизительно 1:180, приблизительно 1:200, приблизительно 200:1, приблизительно 180:1, приблизительно 160:1, приблизительно 140:1, приблизительно 120:1, приблизительно 100:1, приблизительно 90:1, приблизительно 80:1, приблизительно 70:1, приблизительно 60:1, приблизительно 50:1, приблизительно 40:1, приблизительно 30:1, приблизительно 20:1, приблизительно 15:1, приблизительно 10:1, приблизительно 9:1, приблизительно 8:1, приблизительно 7:1, приблизительно 6:1, приблизительно 5:1, приблизительно 4:1, приблизительно 3:1 или приблизительно 2:1. Например, соотношение антитела к МІСА/В и антитела к PD-1, такого как ниволумаб, составляющее 2:1, может означать, что флакон или раствор для инъекции может содержать приблизительно 480 мг антитела к МІСА/В и 240 мг антитела к PD-1 или приблизительно 2 мг/мл антитела к МІСА/В и 1 мг/мл антитела к PD-1.

[0140] Использование термина «постоянная доза» по отношению к способам и дозировкам, описанным в настоящем документе, означает дозу, которую вводят пациенту независимо от веса или площади поверхности тела (BSA) пациента. Постоянная доза, следовательно, не приводится в виде дозы в мг/кг, а вместо этого она приводится в виде абсолютного количества средства (например, антитела к МІСА/В). Например, индивидуум

весом 60 кг и индивидуум весом 100 кг будут получать одинаковую дозу антитела (например, 480 мг антитела к МІСА/В).

[0141] В контексте настоящего документа термины «микрограмм» и «микромоль» применяют взаимозаменяемо с «мкг» и «мкМ» соответственно.

[0142] Различные описанные в настоящем документе аспекты описываются более подробно в следующих подразделах.

II. Антитела к МІСА/В человека

[0143] В настоящем документе описаны антитела, например, полностью человеческие антитела, которые способны к специфическому связыванию с белком А/В, родственным полипептиду I класса МНС (МІСА/В), и ингибированию, предупреждению или снижению сбрасывания МІСА/В опухолевыми клетками, за счет чего обеспечивается повышение сохранения МІСА/В на поверхности опухолевых клеток. Например, антитела специфически связывают МІСА/В человека, и, более конкретно, определенный домен (например, домен $\alpha 3$) в пределах внеклеточного домена МІСА человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела специфически связываются с МІСА/В, за счет чего снижается уровень МІСА/В в сыворотке крови, при этом антитела обеспечивают повышение уровня мембраносвязанного МІСА/В. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к МІСА/В перекрестно реагируют с МІСА/В одного или нескольких отличных от человека приматов, как, например, МІСА/В яванского макака. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела специфически связываются с доменом $\alpha 3$ МІСА/В человека и доменом $\alpha 3$ МІСА/В яванского макака. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с МІСА/В человека с высокой аффинностью.

[0144] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В характеризуются одним или несколькими из следующих функциональных свойств:

- (a) связывание с мембраносвязанным МІСА/В человека;
- (b) связывание с мембраносвязанным МІСА/В яванского макака;
- (c) снижение уровня растворимого МІСА/В в сыворотке крови у субъекта;
- (d) повышение мембраносвязанного МІСА/В на поверхности опухолевой клетки;
- (e) ингибирование, предупреждение или снижение сбрасывания МІСА/В опухолевой клеткой;
- (f) опосредование усиленного процессирования и/или перекрестного представления антигена клеткой;
- (g) опосредование усиленных ADCC и/или ADCP;

- (h) ингибирование роста опухоли и/или метастазирования;
- (i) уменьшение объема опухоли;
- (j) повышение выживаемости без прогрессирования;
- (k) повышение общей выживаемости; и
- (l) любой комбинацией указанного.

[0145] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В связываются с МІСА/В человека с высокой аффинностью, например, с K_D 10^{-6} М или меньше, 10^{-7} М или меньше, 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М или меньше, 10^{-10} М или меньше, 10^{-11} М или меньше, 10^{-12} М или меньше, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М или от 10^{-9} М до 10^{-7} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывается с МІСА/В человека, например, как определено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением BIACORE™ (например, как описано в Примерах), с K_D 10^{-6} М или меньше, 10^{-7} М или меньше, 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М (1 нМ) или меньше, 10^{-10} М или меньше, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М, от 10^{-9} М до 10^{-7} М или от 10^{-8} М до 10^{-7} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывается с sМІСА/В человека, например, как определено с помощью ELISA, например, с использованием набора для ELISA для определения МІСА/В, например, ABCAM ab100592, с EC_{50} 100 нМ или меньше, 10 нМ или меньше, 1 нМ или меньше, от 100 нМ до 0,01 нМ, от 100 нМ до 0,1 нМ, от 100 нМ до 1 нМ или от 10 нМ до 1 нМ, или 10 мкг/мл или меньше, 5 мкг/мл или меньше, 1 мкг/мл или меньше, 0,9 мкг/мл или меньше, 0,8 мкг/мл или меньше, 0,7 мкг/мл или меньше, 0,6 мкг/мл или меньше, 0,5 мкг/мл или меньше, 0,4 мкг/мл или меньше, 0,3 мкг/мл или меньше, 0,2 мкг/мл или меньше, 0,1 мкг/мл или меньше, 0,05 мкг/мл или меньше или 0,01 мкг/мл или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В связываются с МІСА/В яванского макака, например, с K_D 10^{-6} М или меньше, 10^{-7} М или меньше, 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М или меньше, 10^{-10} М или меньше, 10^{-11} М или меньше, 10^{-12} М или меньше, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М или от 10^{-9} М до 10^{-7} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывается с растворимым МІСА/В яванского макака, например, как определено с помощью BIACORE™ (например, как описано в Примерах), с K_D 10^{-6} М или меньше, 10^{-7} М или меньше, 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М (1 нМ) или меньше, 10^{-10} М или меньше, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М, от 10^{-9} М до 10^{-7} М или от 10^{-8} М до 10^{-7} М. Антитела к МІСА/В могут связываться с sМІСА/В яванского макака, например, с EC_{50} 100 нМ или меньше, 10 нМ или меньше, от 100 нМ до 0,01 нМ, от 100 нМ до 0,1 нМ, от

100 нМ до 1 нМ или от 10 нМ до 1 нМ, например, как измерено с помощью ELISA (например, как описано в Примерах).

[0146] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с МІСА/В человека с K_D приблизительно 5×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, 5×10^{-5} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, приблизительно 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с аллельным вариантом МІСА человека МІСА*002 с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с аллельным вариантом МІСА человека МІСА*004 с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с аллельным вариантом МІСА человека МІСА*008 с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с аллельным вариантом МІСА человека МІСА*009 с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с аллельным вариантом МІСВ человека МІСВ*005 с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, приблизительно 1×10^{-5} М или меньше, 1×10^{-6} М или меньше, приблизительно 1×10^{-7} М или меньше или приблизительно 1×10^{-8} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

[0147] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает МІСА/В человека с константой скорости ассоциации (k_a) по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^3 \text{ мс}^{-1}$, по меньшей мере приблизительно $5 \times 10^3 \text{ мс}^{-1}$, по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^4 \text{ мс}^{-1}$, по меньшей мере приблизительно $5 \times 10^4 \text{ мс}^{-1}$, по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^5 \text{ мс}^{-1}$, по меньшей мере приблизительно $5 \times 10^5 \text{ мс}^{-1}$ или по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^6 \text{ мс}^{-1}$, причем k_a измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

[0148] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает МІСА/В человека с константой скорости диссоциации (k_d) приблизительно $0,1 \text{ с}^{-1}$ или меньше, $0,05 \text{ с}^{-1}$ или меньше, $0,01 \text{ с}^{-1}$ или меньше, $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или меньше, $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или меньше, $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или меньше, $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или меньше, $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или меньше или $1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

[0149] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывается с МІСА/В. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает МІСА и МІСВ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает аллельный вариант МІСА*002. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает аллельный вариант МІСА*004. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает аллельный вариант МІСА*008. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает аллельный вариант МІСА*009. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В специфически связывает аллельный вариант МІСА*002, аллельный вариант МІСА*004, аллельный вариант МІСА*008 и аллельный вариант МІСА*009. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает аллельный вариант МІСА*002 с более высокой аффинностью, чем аллельный вариант МІСА*004, аллельный вариант МІСА*008 или аллельный вариант МІСА*009. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает аллельный вариант МІСА*004 с более высокой аффинностью, чем аллельный вариант МІСА*002, аллельный вариант МІСА*008 или аллельный вариант МІСА*008. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает аллельный вариант МІСА*008 с более высокой аффинностью, чем аллельный вариант МІСА*002, аллельный вариант МІСА*004 или аллельный вариант МІСА*009. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает аллельный вариант МІСА*009 с более

высокой аффинностью, чем аллельный вариант MICA*002, аллельный вариант MICA*004 или аллельный вариант MICA*008.

[0150] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL); причем VH содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH (VH-CDR1), VH-CDR2 и VH-CDR3 и VL содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; причем VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37 и 47. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37 и 47. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7.

[0151] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36 и 46. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36 и 46. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6.

[0152] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35 и 45. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35 и 45. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5.

[0153] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38 и 48. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38 и 48. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8.

[0154] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39 и 49. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39 и 49. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9.

[0155] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40 и 50. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40 и 50.

Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10.

[0156] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с эталонным антителом, содержащим VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, содержащее VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10.

[0157] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18, VL-CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA человека с эталонным антителом, содержащим VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20.

[0158] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA человека с эталонным антителом, содержащим VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30.

[0159] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в

в SEQ ID NO:36, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA человека с эталонным антителом, содержащим VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:36, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40.

[0160] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B является гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA человека с эталонным антителом, содержащим VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45, VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47, VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48, VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49, и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50.

[0161] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42.

[0162] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44. Согласно определенным вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44.

[0163] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую

аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:4. Согласно определенным вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4. Согласно одному варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4. Согласно другому варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4, причем антитело является нефукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58 (также называемому «G236A» в соответствии с нумерацией EU).

[0164] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:12. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере

приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:14. Согласно определенным вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14. Согласно другому варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58.

[0165] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:22. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:24. Согласно определенным вариантам осуществления

VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24. Согласно другому варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58.

[0166] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:32. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:34. Согласно определенным вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34. Согласно другому варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34. Согласно некоторым вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34, имеющую вставку в виде остатка Ser между положениями 95 и 96 SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым

вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34, имеющую вставку в виде остатка Ala между положениями 95 и 96 SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34, имеющую вставку в виде остатка Gly между положениями 95 и 96 SEQ ID NO: 34. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58.

[0167] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:42. Согласно определенным вариантам осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:44. Согласно определенным вариантам осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44. Согласно другому варианту осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44.

[0168] Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 58, 62, 66, 70 и 74. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 58, 130, 62, 66, 70 и 74. Согласно определенным вариантам осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи содержит одну или несколько делеций, замен или мутаций в пределах константной области иммуноглобулина, например, в пределах CH1-домена, CH2-домена, CH3-домена или шарнирной области.

[0169] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 60, 64, 68, 72 и 76. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 60, 64, 68, 72 и 76.

[0170] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:60. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. Согласно одному варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60, причем антитело является нефукозилированным. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную

последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60, причем антитело является нефукозилированным. Согласно другому варианту осуществления антитело к МІСА/В перекрестно конкурирует за связывание с МІСА/В человека с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60.

[0171] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:62. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:64. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64. Согласно другому варианту осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64. Согласно

другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64.

[0172] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:66. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:68. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68.

[0173] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:70. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:72. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72. Согласно другому варианту осуществления антитело к MICA/B перекрестно конкурирует за связывание с MICA/B человека с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72.

[0174] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:74. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:74. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:76. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:76. Согласно другому варианту осуществления антитело к МІСА/В содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:74, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:76. Согласно другому варианту осуществления антитело к МІСА/В перекрестно конкурирует за связывание с МІСА/В человека с антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:74, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:76.

[0175] Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианта. Согласно определенному варианту осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В представляет собой IgG1-антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В является

нефукозилированным. Согласно определенным вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В является гипофукозилированным.

[0176] Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В представляет собой антитело человека. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В представляет собой химерное антитело.

[0177] Согласно определенным вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В содержит константную область тяжелой цепи, предусматривающую мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO:58.

А. Эпитопы МІСА/В человека

[0178] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В связывает специфический эпитоп на МІСА/В человека. Термин «эпитоп» в контексте настоящего документа включает любую детерминанту, которая может быть связана антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которую связывает антигенсвязывающий белок, мишенью которого является антиген, и при этом если антиген представляет собой белок, он включает конкретные аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Эпитопы могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи из сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. В целом антитела, специфические в отношении конкретного целевого антигена, в сложной смеси белков и/или макромолекул предпочтительно будут распознавать эпитоп на целевом антигене.

[0179] Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот или по меньшей мере десять аминокислот. Если эпитоп содержит более чем одну аминокислоту, аминокислоты в количестве более чем одна могут быть последовательными, например, G254 и D255, или они могут быть разделены более чем одной аминокислотой, которая прямо не взаимодействует с антителом к МІСА/В, или которая не является необходимой

для связывания MICA/B, например, D255 и L257. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп содержит две последовательные аминокислоты, три последовательные аминокислоты, четыре последовательные аминокислоты, пять последовательных аминокислот, шесть последовательных аминокислот, семь последовательных аминокислот, восемь последовательных аминокислот, девять последовательных аминокислот, десять последовательных аминокислот или более десяти последовательных аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп содержит по меньшей мере две аминокислоты, которые не расположены последовательно, но которые располагаются в непосредственной близости, когда MICA/B находится в его трехмерной конформации.

[0180] Эпитоп на антигене, например, эпитоп на MICA/B человека, который связывается антителом к MICA/B, можно идентифицировать с применением любого известного в данной области способа. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп определяют с применением метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп определяют с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

[0181] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на поверхности MICA человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп в пределах домена $\alpha 3$ MICA человека.

[0182] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 190 и 230 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 195 и 225 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 200 и 221 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 56, как определено с помощью HDX-MS.

[0183] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 230 и 260 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 235 и 255

SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 237 и 253 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 57, как определено с помощью HDX-MS.

[0184] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220 и T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 56 и 57, как определено с помощью HDX-MS.

[0185] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 140 и 170 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 145 и 165 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 149 и 164 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 52, как определено с помощью HDX-MS.

[0186] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 220 и 250 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 225 и 245 SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 230 и 239 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 53, как определено с помощью HDX-MS. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий N234 и/или L237, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS.

[0187] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 245 и 275

SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 250 и 270

SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 252 и 268

SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 55, как определено с помощью HDX-MS. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 254 и 266 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 54, как определено с помощью HDX-MS. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислоты D255-Q265 и W267, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью HDX-MS.

[0188] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 52-54, как определено с помощью HDX-MS. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий SEQ ID NO: 52, 53 и 55, как определено с помощью HDX-MS.

[0189] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 230 и 290 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 235 и 285 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 239 и 280 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 230 и 250 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 235 и 250 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека,

расположенный между аминокислотами 239 и 245 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

[0190] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 245 и 275 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 250 и 270 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 253 и 268 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, расположенный между аминокислотами 257 и 265 SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

[0191] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 и R279, соответствующих SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из G254, D255, L257, Y264 и W267, соответствующих SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий аминокислоты G254, D255, L257, Y264 и W267, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

[0192] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из R240, Q241, D242, V244 и R279, соответствующих SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий аминокислоты R240, Q241, D242, V244 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

[0193] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из P258, G260, G262 и Y264, соответствующих SEQ ID NO:51, как определено с

помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп, содержащий аминокислоты P258, G260, G262 и Y264, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

[0194] Согласно определенным вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 30 ангстрем или меньше, 25 ангстрем или меньше, 30 ангстрем или меньше, приблизительно 15 ангстрем или меньше, приблизительно 10 ангстрем или меньше, приблизительно 9 ангстрем или меньше, приблизительно 8 ангстрем или меньше, приблизительно 7 ангстрем или меньше, приблизительно 6 ангстрем или меньше, приблизительно 5 ангстрем или меньше, приблизительно 4 ангстрема или меньше, приблизительно 3 ангстрема или меньше или приблизительно 2 ангстрема или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью кристаллографического метода, например, с применением описанных в настоящем документе условий. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 10 ангстрем или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью кристаллографического метода, например, с применением описанных в настоящем документе условий. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 10 ангстрем или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: G254, D255, L257, Y264 и W267, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью кристаллографического метода, например, с применением описанных в настоящем документе условий. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 10 ангстрем или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: R240, Q241, D242, V244 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью кристаллографического метода, например, с применением описанных в настоящем документе условий. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 10 ангстрем или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: P258, G260, G262 и

Y264, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью кристаллографического метода, например, с применением описанных в настоящем документе условий. Согласно определенным вариантам осуществления, когда антитело к MICA/B связывается с MICA человека, антитело располагается на расстоянии приблизительно 30 ангстрем или меньше, 25 ангстрем или меньше, 20 ангстрем или меньше, приблизительно 15 ангстрем или меньше, приблизительно 10 ангстрем или меньше, приблизительно 9 ангстрем или меньше, приблизительно 8 ангстрем или меньше, приблизительно 7 ангстрем или меньше, приблизительно 6 ангстрем или меньше, приблизительно 5 ангстрем или меньше, приблизительно 4 ангстрема или меньше, приблизительно 3 ангстрема или меньше или приблизительно 2 ангстрема или меньше по меньшей мере от одного из следующих остатков MICA человека: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов, например, с применением описанных в настоящем документе условий.

[0195] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 остатков, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере два остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере четыре остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере шесть остатков, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251,

Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

[0196] Описанные в настоящем документе VH-домен или одна или несколько его CDR могут быть связаны с константным доменом с образованием тяжелой цепи, например, полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично, описанные в настоящем документе VL-домен или одна или несколько его CDR могут быть связаны с константным доменом с образованием легкой цепи, например, полноразмерной легкой цепи. Полноразмерная тяжелая цепь (необязательно за исключением С-концевого лизина (K) или за исключением С-концевого глицина и лизина (GK), которые могут отсутствовать) и полноразмерная легкая цепь могут объединяться с образованием полноразмерного антитела.

[0197] Описанный в настоящем документе VH-домен можно сливать с константным доменом IgG человека, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые являются либо встречающимися в природе, либо модифицированными, например, как описано далее в настоящем документе. Например, VH-домен может содержать аминокислотную последовательность любого VH-домена, описанного в настоящем документе, слитую с последовательностью константной области IgG человека, например, IgG1, такой как следующая аминокислотная последовательность константного домена IgG1 дикого типа человека:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91,

или такового аллотипического варианта SEQ ID NO: 91, и они имеют следующие аминокислотные последовательности:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRЕМTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92; аллотип-специфические аминокислотные остатки обозначены жирным шрифтом и подчеркнуты).

[0198] VH-домен антитела к MICA/B может содержать аминокислотную последовательность любого VH-домена, описанного в настоящем документе, слитую с

последовательностью лишенной эффекторной функции константной области, например, следующими аминокислотными последовательностями лишенного эффекторной функции константного домена IgG1 человека:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 93; «IgG1.1f», предусматривающее замены L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, которые являются подчеркнутыми)

или

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94; «IgG1.3f», предусматривающее замены L234A, L235E и G237A, которые являются подчеркнутыми).

[0199] Например, аллотипический вариант IgG1 содержит K97R, D239E и/или L241M (подчеркнуты и обозначены жирным шрифтом выше) в соответствии с нумерацией в SEQ ID NO: 91. В пределах полноразмерной константной области тяжелой цепи, например, MICA.36 (SEQ ID NO: 58), и в соответствии с нумерацией EU, такие аминокислотные замены имеют номера K214R, D356E и L358M. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область антитела к MICA/B может дополнительно предусматривать одну или несколько мутаций или замен по аминокислотам L117, A118, G120, A213 и P214 (подчеркнуты выше) в соответствии с нумерацией в SEQ ID NO: 92, 93 и 94 или L234, A235, G237, A330 и P331 согласно нумерации EU. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область антитела к MICA/B содержит одну или несколько мутаций или замен по аминокислотам L117A, A118E, G120A, A213S и P214S SEQ ID NO: 91 или L234A, L235E, G237A, A330S и P331S согласно нумерации EU. Константная область антитела к MICA/B также может предусматривать одну или несколько мутаций или замен L117A, A118E и G120A SEQ ID NO: 91 или L234A, L235E и G237A согласно нумерации EU

[0200] В качестве альтернативы, VH-домен антитела к MICA/B может содержать аминокислотную последовательность любого VH-домена, описанного в настоящем документе, слитую с последовательностью константной области IgG4 человека, например, следующей аминокислотной последовательностью IgG4 человека или ее вариантами:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLTQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 95, предусматривающая S228P).

[0201] Описанный в настоящем документе VL-домен можно сливать с константным доменом легкой каппа- или лямбда-цепи человека. Например, VL-домен антитела к MICA/B может содержать аминокислотную последовательность любого VL-домена, описанного в настоящем документе, слитую со следующей аминокислотной последовательностью легкой каппа-цепи IgG1 человека:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 96)

[0202] Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи содержит лизин или другую аминокислоту на С-конце, например, она содержит следующие концевые аминокислоты: LSPGK (SEQ ID NO: 97) в тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления в константной области тяжелой цепи отсутствуют одна или несколько аминокислот на С-конце, и она содержит, например, С-концевую последовательность LSPG (SEQ ID NO: 98) или LSP (SEQ ID NO: 99).

[0203] Аминокислотные последовательности иллюстративных тяжелых и легких цепей описаны в настоящем документе.

[0204] В настоящем документе представлены выделенные антитела к MICA/B человека или их антигенсвязывающая часть, содержащие:

(a1) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO: 58 и 60 соответственно;

(a2) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO: 130 и 60 соответственно;

(a3) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO: 62 и 64 соответственно;

(a4) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO: 66 и 68 соответственно;

(а5) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO:70 и 72 соответственно;

(а6) последовательности тяжелой и легкой цепей, предусматривающие SEQ ID NO: 74 и 76 соответственно;

где антитело специфически связывается с МІСА/В человека.

[0205] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит комбинированный набор последовательностей тяжелой и легкой цепей, изложенный в настоящем документе, например, в предшествующем разделе, где антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи и дополнительно может содержать по меньшей мере одну дисульфидную связь, соединяющую две тяжелые цепи вместе. Антитела также могут содержать дисульфидные связи, соединяющие каждую из легких цепей с каждой из тяжелых цепей.

[0206] Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 70% идентична любой из последовательностей тяжелых или легких цепей, изложенных в настоящем документе (или их переменных областей), например, SEQ ID NO: 58 и 60, можно применять для образования антител к МІСА/В человека с требуемыми характеристиками, например, антител, описанных далее в настоящем документе. Иллюстративные варианты представляют собой варианты, предусматривающие аллотипическую вариацию, например, в константном домене, и/или мутацию в переменной или константной области, например, раскрытые в настоящем документе мутации. Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислоту (за счет замены, добавления или делеции) от любой из последовательностей тяжелых или легких цепей, изложенных в настоящем документе (или их переменных областей), можно применять для образования антител к МІСА человека с требуемыми характеристиками, например, антител, описанных далее в настоящем документе.

[0207] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В содержит переменную область тяжелой цепи, кодируемую конкретным геном тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии, и/или переменную область легкой цепи, кодируемую конкретным геном легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии.

[0208] Как продемонстрировано в настоящем документе, были получены антитела человека, специфические в отношении МІСА/В, содержащие переменную область тяжелой цепи, которая является продуктом гена зародышевой линии человека или происходит из него. Следовательно, в настоящем документе предусмотрены выделенные

моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие переменную область тяжелой цепи, которая является продуктом гена VH зародышевой линии человека, выбранного из группы, состоящей из: 3-09, 3-10, 3-33, 3-48, 5-51, 6-13, JH3b, JH4b, JH6b и любой их комбинации, или происходит из них.

[0209] Были получены антитела человека, специфические в отношении MICA/B, содержащие переменную область легкой цепи, которая является продуктом гена зародышевой линии человека или происходит из него. Следовательно, в настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие переменную область легкой цепи, которая является продуктом гена VK зародышевой линии человека, выбранного из группы, состоящей из: A27, L6, L18, JK1, JK2, JK3, JK5 и любой их комбинации, или происходит из них.

[0210] Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B включают таковые, которые содержат переменную область тяжелой цепи, которая является продуктом одного из вышеперечисленных генов VH зародышевой линии человека, или происходит из них, и также содержат переменную область легкой цепи, которая является продуктом одного из вышеперечисленных генов VK зародышевой линии человека, или происходит из них, как показано на фигурах.

[0211] В контексте настоящего документа антитело человека содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые являются «продуктом» или «происходят из» конкретной последовательности зародышевой линии, если переменные области антитела получены с применением системы, в которой используются гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулинов человека, представляющим интерес антигеном или скрининг библиотеки генов иммуноглобулинов человека, представленных на поверхности фагов, с использованием представляющего интерес антигена. Антитело человека, которое является «продуктом» или «происходит из» последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, можно идентифицировать как таковое путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и выбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которая по последовательности является наиболее близкой (т. е. наиболее высокая % идентичность) последовательности антитела человека. Антитело человека, которое является «продуктом» или «происходит из» конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может предусматривать отличие по

аминокислотам в сравнении с последовательностью зародышевой линии, вследствие, например, встречающихся в природе соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Однако, выбранное антитело человека, как правило, характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые позволяют идентифицировать антитело человека именно как человеческое при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов других видов (например, последовательностей зародышевой линии мыши). В некоторых случаях антитело человека может характеризоваться по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, антитело человека, происходящее из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отличаться не более чем на 10 аминокислот от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных случаях антитело человека может отличаться не более чем на 5 или даже не более чем на 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

[0212] Антитела к MICA/B могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из таких последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности в соответствии с описанными в настоящем документе антителами к MICA/B, или предусматривать их консервативные модификации, и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства описанных в настоящем документе антител к MICA/B.

[0213] Консервативные аминокислотные замены могут быть выполнены в частях антител, отличных от CDR, или вдобавок к ним. Например, консервативные аминокислотные модификации могут быть выполнены в каркасной области или в Fc-области. Переменная область или тяжелая или легкая цепи могут предусматривать 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 консервативных аминокислотных замен по сравнению с представленными в настоящем документе последовательностями антитела к MICA/B. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B содержит комбинацию консервативных и неконсервативных аминокислотных модификаций.

[0214] Также представлены сконструированные и модифицированные антитела, которые можно получать с применением антитела с одной или несколькими из раскрытых в настоящем документе последовательностей VH и/или VL в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. Антитело может быть сконструировано путем модифицирования одного или нескольких остатков в пределах одной или обеих переменных областей (т. е. VH и/или VL), например, в пределах одной или нескольких CDR-областей и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Кроме того, или в качестве альтернативы, антитело может быть сконструировано путем модифицирования остатков в пределах константной(-ых) области(-ей), например, с целью изменения эффекторной(-ых) функции(-й) антитела.

[0215] Одним из типов конструирования переменных областей, которые можно осуществлять, является прививание CDR. Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в пределах шести определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR более разнообразны среди отдельных антител, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно обеспечивать экспрессию рекомбинантных антител, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, путем конструирования векторов экспрессии, включающих последовательности CDR из специфического встречающегося в природе антитела, привитые на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033; заявку на выдачу патента США № 5225539, Winter, и заявки на выдачу патента США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, Queen *et al.*)

[0216] Следовательно, некоторые описанные в настоящем документе варианты осуществления относятся к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую описанные в настоящем документе последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую описанные в настоящем документе последовательности CDR1, CDR2 и CDR3. Таким образом, такие антитела содержат последовательности CDR VH и VL описанных в настоящем документе моноклональных

антител, но могут содержать каркасные последовательности, отличающиеся от таковых у указанных антител.

[0217] Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных материалов, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельных областей тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека «VBase» (доступной в интернете на сайте www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, Министерство здравоохранения и социальных служб США, публикация NIH № 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops". *Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержания каждой из которых явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0218] Согласно некоторым вариантам осуществления каркасные последовательности для применения в описанных в настоящем документе антителах к MICA/B представляют собой каркасные последовательности, которые являются подобными по структуре каркасным последовательностям, применяемым в описанных в настоящем документе антителах к MICA/B. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L можно прививать на каркасные области, которые содержат последовательность, идентичную таковой, обнаруживаемой для гена иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно прививать на каркасные области, которые предусматривают одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в определенных случаях преимущественным является мутирование остатков в пределах каркасных областей с целью сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, заявки на выдачу патента США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, Queen *et al.*).

[0219] Сконструированные описанные в настоящем документе антитела MICA/B включают антитела, в которых модификации были выполнены по отношению к остаткам каркасной области в пределах V_H и/или V_L, например, с целью улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасной области выполняют с целью уменьшения иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является «обратная

мутация» одного или нескольких остатков каркасной области к соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подвергалось соматической мутации, может содержать остатки каркасной области, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасной области в их конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации можно подвергать «обратной мутации» к последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Подразумевается, что такие антитела с «обратными мутациями» также охвачены. Другой тип модификации каркасной области включает мутирование одного или нескольких остатков в пределах каркасной области, или даже в пределах одной или нескольких CDR-областей, с целью удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы тем самым снизить возможную иммуногенность антитела. Этот подход также называют «деиммунизацией», и он более подробно описан в публикации заявки на выдачу патента США № 20030153043 Carr *et al.*

[0220] Другой тип модификации вариабельной области заключается в мутации аминокислотных остатков в пределах CDR1-, CDR2- и/или CDR3-областей VH и/или VL для улучшения тем самым одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Для введения мутации(-й) можно осуществлять сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, и эффект в отношении связывания антитела, или другого представляющего интерес функционального свойства, можно оценивать в *in vitro* или *in vivo* анализах, описанных в настоящем документе и представленных в примерах. Согласно некоторым вариантам осуществления вводят консервативные модификации (как обсуждалось выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции. Кроме того, как правило, в пределах CDR-области изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

[0221] Метиониновые остатки в CDR антител могут быть окислены, что приводит к потенциальному химическому разрушению и последующему снижению активности антитела. Следовательно, также представлены антитела к MICA/B, которые предусматривают замещение одного или нескольких метиониновых остатков в CDR тяжелой и/или легкой цепей аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному разрушению. Согласно некоторым вариантам осуществления метиониновые остатки в CDR антител MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2

замещают аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному разрушению.

[0222] Аналогично, из антител к MICA/B, в частности, CDR, можно удалять сайты дезамидирования.

[0223] Описанные в настоящем документе переменные области, связывающиеся с MICA/B, могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может быть любого аллотипа или изоаллотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); и для K: Km, Km1, Km2, Km3 (см., например, Jefferies *et al.* (2009) mAbs 1:1).

[0224] В целом, описанные в настоящем документе переменные области могут быть связаны с Fc, предусматривающим одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке крови, связывание комплемента, связывание с Fc-рецептором, антигензависимая клеточная цитотоксичность и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз. Кроме того, описанное в настоящем документе антитело может быть химически модифицировано (например, к антителу могут быть присоединены одно или несколько химических веществ) или модифицировано с целью изменения его гликозилирования, с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления описан более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc-области представлена в соответствии с EU-индексом по Kabat.

[0225] Fc-область охватывает домены, происходящие из константной области иммуноглобулина, включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производное константной области. Подходящие иммуноглобулины включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие классы, такие как IgA, IgD, IgE и IgM. Константная область иммуноглобулина определена как встречающийся в природе или полученный синтетическим путем полипептид, гомологичный C-концевой области иммуноглобулина, и она может включать CH1-домен, шарнир, CH2-домен, CH3-домен или CH4-домен, отдельно или в комбинации.

[0226] Молекулы Ig взаимодействуют с множеством классов клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fcγ-рецепторов (FcγR), специфических в отношении IgG-класса антитела, а именно FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Было описано, что последовательности, важные для связывания IgG с FcγR-рецепторами, расположены в CH2- и CH3-доменах. На время полужизни антитела в сыворотке крови влияет способность этого антитела связываться с Fc-рецептором (FcR).

[0227] Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, например, последовательность Fc, которая была модифицирована (например, путем аминокислотной замены, делеции и/или вставки) по сравнению с исходной последовательностью Fc (например, немодифицированным полипептидом Fc, который впоследствии модифицируют для получения варианта) с целью обеспечения желательных структурных признаков и/или биологической активности.

[0228] В целом, варианты константной области или ее частей, например, CH1-, CL-, шарнира, CH2- или CH3-доменов, могут предусматривать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций и/или не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, или 1-10 или 1-5 мутаций, или они содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична таковой соответствующих области или домена дикого типа (CH1-, CL-, шарнира, CH2- или CH3-домена соответственно), при условии, что константная область тяжелой цепи, содержащая конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

[0229] Например, можно выполнять модификации в Fc-области с целью получения варианта Fc, который (a) опосредует повышенные или пониженные антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (b) опосредует повышенную или пониженную комплементопосредованную цитотоксичность (CDC), (c) характеризуется повышенной или пониженной аффинностью к C1q и/или (d) характеризуется повышенной или пониженной аффинностью к Fc-рецептору по сравнению с исходной Fc. Такие варианты Fc-области в целом будут предусматривать по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области. Считается, что комбинирование аминокислотных модификаций является особенно желательным. Например, вариантная Fc-область может предусматривать две, три, четыре, пять и т. д. замен в ней, например, в конкретных положениях Fc-области, идентифицированных в настоящем документе.

[0230] Вариантная Fc-область также может предусматривать изменение последовательности, при котором аминокислоты, вовлеченные в образование дисульфидной связи, удаляют или замещают другими аминокислотами. Такое удаление позволяет избежать реакции с другими содержащими цистеин белками, присутствующими в клетке-хозяине, применяемой для получения описанных в настоящем документе антител к MICA/B. Даже в случае удаления цистеиновых остатков одноцепочечные Fc-домены все еще могут образовывать димерный Fc-домен, который удерживается нековалентно. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-область можно модифицировать, чтобы сделать ее более совместимой с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалять

последовательность РА вблизи N-конца типичной нативной Fc-области, которую может распознать расщепляющий фермент в *E. coli*, такой как пролиниминопептидаза. Согласно некоторым вариантам осуществления можно удалять один или несколько сайтов гликозилирования в пределах Fc-домена. Остатки, которые обычно являются гликозилированными (например, аспарагин), могут обуславливать цитолитический ответ. Такие остатки можно удалять или заменять негликозилированными остатками (например, аланином). Согласно некоторым вариантам осуществления из Fc-области можно удалять сайты, вовлеченные во взаимодействие с комплементом, как, например, сайт связывания C1q. Например, можно удалять или заменять последовательность ЕКК IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления можно удалять сайты, которые влияют на связывание с Fc-рецепторами, предпочтительно сайты, отличные от сайтов связывания рецептора реутилизации. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-область можно модифицировать с целью удаления сайта, обуславливающего ADCC. Сайты, обуславливающие ADCC, известны в данной области; см., например, *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992), что касается сайтов, обуславливающих ADCC, в IgG1. Конкретные примеры вариантных Fc-доменов раскрыты, например, в WO 97/34631, WO 96/32478 и WO07/041635.

[0231] Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирную область Fc модифицируют с тем, чтобы изменить число цистеиновых остатков в шарнирной области, например, увеличить или уменьшить. Такой подход дополнительно описан в заявке на выдачу патента США № 5677425 Bodmer *et al.* Число цистеиновых остатков в шарнирной области Fc изменяют, например, для содействия сборке легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирную область Fc антитела подвергают мутации для уменьшения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, в граничную область СН2- и СН3-домена фрагмента Fc-шарнир вводят одну или несколько аминокислотных мутаций, вследствие чего антитело характеризуется нарушенной способностью к связыванию белка А стафилококка (SpA) по сравнению со связыванием SpA у нативного домена Fc-шарнир. Такой подход описан более подробно в заявке на выдачу патента США № 6165745 Ward *et al.*

[0232] Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-область изменяют путем замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком с целью изменения эффекторной(-ых) функции(-й) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330 и/или 331, можно замещать другим аминокислотным остатком с тем,

чтобы антитело характеризовалось измененной аффинностью к эффекторному лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, по отношению к которому изменяют аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Такой подход описан более подробно в заявке на выдачу патента США №№ 5624821 и 5648260, оба Winter *et al.*

[0233] Согласно другому примеру, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно замещать другим аминокислотным остатком с тем, чтобы антитело характеризовалось измененным связыванием C1q и/или сниженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Такой подход описан более подробно в заявке на выдачу патента США № 6194551 Idusogie *et al.*

[0234] Согласно другому примеру, один или несколько аминокислотных остатков в пределах положений аминокислот 231 и 239 изменяют с тем, чтобы изменить способность антитела связывать комплемент. Такой подход дополнительно описан в публикации согласно PCT WO 94/29351 Bodmer *et al.*

[0235] Согласно другому примеру, Fc-область можно модифицировать с целью повышения аффинности к Fcγ и повышения макрофаг-опосредованного фагоцитоза. См., например, Richard *et al.*, Mo. Cancer. Ther. 7(8):2517-27 (2008), которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно определенным вариантам осуществления Fc-область можно модифицировать с целью повышения аффинности к FcγRIIa, нежели к ингибирующему FcγRIIb. Была идентифицирована одна конкретная точечная мутация, G236A (нумерация для которой приведена в соответствии с EU-индексом), которая обуславливает повышенную аффинность к FcγRIIa, нежели к ингибирующему FcγRIIb. Повышенная аффинность к FcRIIa коррелировала с повышенным макрофаг-опосредованным фагоцитозом, в сравнении с нативным IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-область антитела к MICA/B содержит одну или несколько мутаций или комбинацию мутаций, выбранных из G236A, I332E, S239/I332E, I332E/G236A и S239D/I332E/G236A. Другие модификации Fc-области могут обеспечить повышение антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), например, за счет повышения аффинности к активирующим рецепторам, таким как FcγRI и/или FcγRIIa. Например, замена G236A и комбинация замены G236A и модификаций, которые обуславливают повышение аффинности к активирующим рецепторам (например, FcγRI и/или FcγRIIa), например, включая без ограничения замены по 332 и 239, обеспечивают в значительной степени улучшенную ADCC по сравнению с исходным антителом WT. См. заявку на выдачу патента США № 9040041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0236] Согласно другому примеру, Fc-область можно модифицировать с целью снижения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или снижения аффинности к Fcγ-рецептору путем модифицирования одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. Иллюстративные замены включают 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Другие модификации для усиления взаимодействий с FcγR и комплементом включают без ограничения замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

[0237] Модификации Fc, которые обеспечивают повышение способности к связыванию с Fcγ-рецептором, включают аминокислотные модификации в любом одном или нескольких из положений аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 Fc-области, где нумерация остатков в Fc-области представлена в соответствии с EU-индексом по Kabat (WO00/42072).

[0238] Необязательно, Fc-область может содержать не встречающийся в природе аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области (см., например, патенты США №№ 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; 9040041; патентные публикации согласно РСТ WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217; WO 05/092925; и WO 06/020114).

[0239] Показатели аффинности и свойства связывания Fc-области по отношению к его лиганду можно определять с помощью ряда известных в данной области способов с применением *in vitro* анализов (биохимических или иммунологических анализов), включая без ограничения способы с определением константы равновесия (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) или радиоиммунологический анализ (RIA)) или способы с определением кинетических параметров (например, анализ с применением

системы BIACORE), и другие способы, такие как непрямые анализы связывания, конкурентные анализы ингибирования, метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В этих и других способах может использоваться метка на одном или нескольких из подлежащих исследованию компонентах и/или может использоваться ряд способов выявления, включая без ограничения применение хромогенных, флуоресцентных, люминесцентных или изотопных меток. Подробное описание показателей аффинности связывания и кинетики можно найти в Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой акцент делается на взаимодействиях антитело-иммуноген.

[0240] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, такой подход можно осуществлять путем повышения аффинности связывания Fc-области к FcRn, например, можно подвергать мутации один или несколько из следующих остатков: 252, 254, 256, 433, 435, 436, как описано в заявке на выдачу патента США № 6277375. Конкретные иллюстративные замены включают одну или несколько из следующих: T252L, T254S и/или T256F. В качестве альтернативы, для увеличения биологического времени полужизни антитело можно подвергать изменениям в пределах CH1- или CL-области так, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в заявках на выдачу патента США №№ 5869046 и 6121022 Presta *et al.* Другие иллюстративные варианты, которые обеспечивают повышение способности к связыванию с FcRn и/или улучшение фармакокинетических свойств, включают замены в положениях 259, 308, 428 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434I, 434F, 434Y и 434X1. Другие варианты, которые обеспечивают повышение способности Fc к связыванию с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.* 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua *et al.* *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua *et al.*, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). Другие модификации для модулирования связывания с FcRn описаны в Yeung *et al.*, 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671.

[0241] Согласно некоторым вариантам осуществления можно применять гибридные изотипы IgG с определенными биологическими характеристиками. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замены по положениям IgG1 в CH2- и/или CH3-области аминокислотами из IgG3 в положениях, по которым два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное IgG-антитело, которое содержит одну или несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. Согласно некоторым описанным в настоящем документе вариантам осуществления гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены по положениям IgG2 в CH2- и/или CH3-области аминокислотами из IgG1 в положениях, по которым два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное IgG-антитело, которое содержит одну или несколько замен, например, одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относительно вставки глицина в положении 236) и 327A.

[0242] Кроме того, было проведено картирование центров связывания IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенными свойствами связывания (см. Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Было показано, что конкретные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 обеспечивают улучшение свойств связывания FcγRIII. Кроме того, было показано, что следующие комбинационные мутанты обеспечивают улучшение свойств связывания FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A, которые, как было показано, характеризуются усиленной способностью к связыванию FcγRIIIa и ADCC-активностью (Shields *et al.*, 2001). Были идентифицированы другие варианты IgG1 со значительно усиленной способностью к связыванию с FcγRIIIa, включая варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, для которых было показано наибольшее повышение аффинности к FcγRIIIa, снижение способности к связыванию FcγRIIb и сильная цитотоксическая активность у яванских макаков (Lazar *et al.*, 2006). Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфическое), трастузумаб (HER2/neu-специфическое), ритуксимаб (CD20-специфическое) и цетуксимаб (EGFR-специфическое) обуславливало значительно усиленную ADCC-активность *in vitro*, и для варианта S239D/I332E наблюдали усиленную способность к сокращению числа В-клеток у обезьян (Lazar *et al.*, 2006). Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, предусматривающие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, которые характеризовались усиленной способностью к связыванию с FcγRIIIa и одновременно усиленной ADCC-активностью у трансгенных мышей, у которых экспрессируется FcγRIIIa

человека, в моделях злокачественных новообразований из В-клеток и рака молочной железы (Stavenhagen *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2011). Другие мутанты Fc, которые можно применять, включают: S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L и M428L/N434S.

[0243] Было показано, что конкретные мутации в положениях 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 и 332 обеспечивают улучшение способности к связыванию с FcγRIIIa и/или снижение способности к связыванию FcγRIIIb, что приводит к усиленным ADCC- и/или ADCP-активности (Richards *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 7(8):2517-2527; заявка на выдачу патента США № 9040041). В частности, варианты Fc, которые обеспечивают избирательное улучшение способности к связыванию с одним или несколькими активирующими рецепторами человека, нежели с FcγRIIIb, или избирательное улучшение способности к связыванию с FcγRIIIb, нежели с одним или несколькими активирующими рецепторами, могут предусматривать замену, выбранную из группы, состоящей из 234G, 234I, 235D, 235E, 235I, 235Y, 236A, 236S, 239D, 267D, 267E, 267Q, 268D, 268E, 293R, 295E, 324G, 324I, 327H, 328A, 328F, 328I, 330I, 330L, 330Y, 332D и 332E. Дополнительные замены, которые также можно комбинировать, включают другие замены, которые обеспечивают модуляцию аффинности к FcγR и активности в отношении комплемента, включая без ограничения 298A, 298T, 326A, 326D, 326E, 326W, 326Y, 333A, 333S, 334L и 334A (заявка на выдачу патента США № 6737056; Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604; заявка на выдачу патента США № 6528624; Idusogie *et al.*, 2001, *J. Immunology* 166:2571-2572). Предпочтительные варианты, которые могут быть особенно пригодны для комбинации с другими вариантами Fc, включают таковые, предусматривающие замены 298A, 326A, 333A и 334A. Дополнительные замены, которые можно комбинировать с FcγR-избирательными вариантами, включают 247L, 255L, 270E, 392T, 396L и 421K (заявка на выдачу патента США № 10/754922; заявка на выдачу патента США № 10/902588); и 280H, 280Q и 280Y (заявка на выдачу патента США № 10/370749).

[0244] В случае применения константного домена IgG4 можно включать замену S228P, которая обеспечивает имитацию шарнирной последовательности в IgG1, и тем самым стабилизирует молекулы IgG4.

III. Отсутствие фукозилирования, гипофукозилирование и пониженная степень фукозилирования

[0245] Согласно некоторым вариантам осуществления можно модифицировать гликозилирование антитела. Например, можно получать агликозилированное антитело (т. е. антитело, которое не подвергается гликозилированию). Гликозилирование можно изменять, например, с целью повышения аффинности антитела к антигену. Такие

модификации углеводами можно осуществлять, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно выполнять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования в каркасной последовательности вариабельной области, с целью устранения, тем самым, гликозилирования по этому сайту. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход описан более подробно в заявках на выдачу патента США №№ 5714350 и 6350861 Co *et al.*

[0246] Гликозилирование константной области по N297 может быть предотвращено путем мутирования с заменой остатка N297 другим остатком, например, N297A, и/или путем мутирования соседней аминокислоты, например 298, чтобы тем самым понизить степень гликозилирования по N297.

[0247] Взаимодействие антител с FcγR также может быть усилено путем модифицирования гликанового фрагмента, присоединенного к каждому Fc-фрагменту по остатку N297. В частности, отсутствие коровьих остатков фукозы обуславливает усиление ADCC за счет улучшенного связывания IgG с активирующим FcγRIIIA без изменения свойств связывания антигена или CDC. Natsume *et al.* (2009) *Drug Des. Devel. Ther.* 3:7. Имеются убедительные данные, что афукозилированные опухолеспецифические антитела обеспечивают усиленную терапевтическую активность в мышинных моделях *in vivo*. Nimmerjahn & Ravetch (2005) *Science* 310:1510; Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393. Модификацию гликозилирования антител можно осуществлять, например, путем обеспечения экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по настоящему раскрытию, с получением тем самым антитела с измененным паттерном гликозилирования. Например, у клеточных линий Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α-(1,6)-фукозилтрансфераза (см. публикацию заявки на выдачу патента США № 20040110704; Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87: 614), так что эти антитела, экспрессируемые в таких клеточных линиях, не содержат фукозы в их углеводных компонентах. В качестве другого примера, в EP 1176195 также описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, а также клеточные линии, которые обладают незначительной активностью в отношении присоединения фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела, или вовсе не обладают такой активностью, например, клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации

согласно РСТ WO 03/035835 описана вариантная клеточная линия CHO, Lec13, со сниженной способностью к присоединению фукозы к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в такой клетке-хозяине. См. также Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733. Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также могут быть получены в куриных яйцах, как описано в публикации согласно РСТ № WO 2006/089231. В качестве альтернативы, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в растительных клетках, таких как клетки *Lemna*. См., например, публикацию США № 2012/0276086. В публикации согласно РСТ № WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные с возможностью экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминтрансферазы III (GnTIII)), вследствие чего антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, характеризуются повышенным содержанием структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, что обуславливает повышенную ADCC-активность антител. См. также Umaña *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176. В качестве альтернативы, остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с применением фермента фукозидазы. Например, фермент альфа-L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител. Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516. Антитела с пониженной степенью фукозилирования также могут быть получены в клетках, имеющих рекомбинантный ген, кодирующий фермент, который в качестве субстрата использует ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозу, такой как ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулоредуктаза (RMD), как описано в заявке на выдачу патента США № 8642292. В качестве альтернативы, клетки можно выращивать в среде, содержащей аналоги фукозы, которые блокируют добавление остатков фукозы к N-сцепленному гликану или гликопротеину, такому как антитело, продуцируемое выращиваемыми в среде клетками. Заявка на выдачу патента США № 8163551; WO 09/135181.

[0248] Поскольку нефукозилированные антитела характеризуются значительно усиленными ADCC и/или ADCP по сравнению с фукозилированными антителами, препараты антител не обязательно должны быть полностью лишены фукозилированных тяжелых цепей, чтобы быть пригодными в настоящем изобретении. Остаточные уровни фукозилированных тяжелых цепей не будут значимо влиять на ADCC- и/или ADCP-активность препарата в основном нефукозилированных тяжелых цепей. Антитела, полученные в традиционных клетках CHO, которые являются полностью компетентными в отношении добавления корового остатка фукозы к N-гликанам, могут, тем не менее, включать от нескольких процентов до 15% нефукозилированных антител. Нефукозилированные антитела могут характеризоваться в десять раз более высокой

аффинностью к CD16, и 30-100-кратным усилением ADCC- и/или ADCP-активности, так что даже небольшое увеличение доли нефукозилированных антител может значительно повысить ADCC- и/или ADCP-активность препарата. Любой препарат, содержащий большее количество нефукозилированных антител, чем вырабатывалось бы в обычных клетках CHO в культуре, может характеризоваться некоторым уровнем усиленных ADCC и/или ADCP. Такие препараты антител в настоящем документе называют препаратами с пониженной степенью фукозилирования. В зависимости от исходного уровня нефукозилированных антител, полученного в обычных клетках CHO, препараты с пониженной степенью фукозилирования могут содержать 80%, 70%, 60%, 50%, 30%, 20%, 10% и даже 5% нефукозилированных антител. Пониженная степень фукозилирования может быть функционально определена как препараты, характеризующиеся 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, двукратным, трехкратным или более усилением ADCC и/или ADCP по сравнению с антителами, полученными в обычных клетках CHO, и без указания какой-либо фиксированной процентной доли нефукозилированных молекул.

[0249] Уровень отсутствия фукозилирования может быть структурно определен. В контексте настоящего документа «нефукозилированный» или «афукозилированный» (термины применяют как синонимы) относится к препаратам антител, в которых более 95% тяжелых цепей не содержат фукозы, как, например, более 96%, более 97%, более 98%, более 99% или 100%. Термин «гипофукозилированный» относится к препаратам антител, в которых более 80% и 95% или менее тяжелых цепей не содержат фукозы, например, препаратам антител, в которых от 85 до 95%, от 80 до 85%, от 80 до 90%, от 85 до 90% или от 90 до 95% тяжелых цепей не содержат фукозы. Термин «гипофукозилированный или нефукозилированный» относится к препаратам антител, в которых 80% или более тяжелых цепей не содержат фукозы. Термин «пониженная степень фукозилирования» относится к препаратам антител, в которых от 10 до 80% тяжелых цепей не содержат фукозы, как, например, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80%, 60-80%, 70-80%, 20-70%, 30-70%, 40-70%, 50-70%, 60-70%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 50-60%, 20-50%, 30-50%, 40-50%, 20-40%, 30-40%, 10-20%, 10-30% или 20-30%.

[0250] Согласно некоторым вариантам осуществления гипофукозилированные или нефукозилированные антитела к MICA/B можно получать в клетках, у которых отсутствует фермент, необходимый для фукозилирования, такой как FUT8 (например, заявка на выдачу патента США № 7214775), или в клетках, в которых экзогенный фермент частично истощает пул веществ-предшественников для фукозилирования (например, заявка на выдачу патента США № 8642292), или в клетках, культивируемых в присутствии

низкомолекулярного ингибитора фермента, вовлеченного в процесс фукозилирования (например, WO 09/135181).

[0251] Уровень фукозилирования в препарате антител можно определять с помощью любого известного в данной области способа, включая без ограничения гель-электрофорез, капиллярный электрофорез, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень фукозилирования в препарате антител можно определять с помощью хроматографии с гидрофильным взаимодействием (или жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием, HILIC). Согласно некоторым вариантам осуществления для определения уровня фукозилирования в препарате антител образцы подвергают денатурации путем обработки PNGазой F для отщепления N-сцепленных гликанов, которые затем анализируют на предмет содержания фукозы. LC/MS цепей полноразмерного антитела является альтернативным способом определения уровня фукозилирования в препарате антител, однако масс-спектропия по своей природе является в меньшей степени количественной.

[0252] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут характеризоваться пониженной степенью фукозилирования или могут быть гипофукозилированными или нефукозилированными. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут характеризоваться пониженной степенью фукозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут быть гипофукозилированными. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут быть нефукозилированными.

[0253] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут предусматривать i) одну или несколько аминокислотных мутаций в Fc-области для изменения способности к связыванию с FcγR и необязательно ii) пониженную степень фукозилирования или устраненное фукозилирование. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут предусматривать одну или несколько аминокислотных мутаций в Fc-области для изменения способности к связыванию с FcγR и могут быть гипофукозилированными или нефукозилированными. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут предусматривать одну или несколько аминокислотных мутаций в Fc-области для изменения способности к связыванию с FcγR и могут быть нефукозилированными.

[0254] Другой модификацией описанных в настоящем документе антител к МІСА/В является пегилирование. Антитело может быть пегилировано, например, с целью увеличения биологического (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для пегилирования антитела, как правило, проводят реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолем (ПЭГ), как, например, реакционноспособным сложным эфиром ПЭГ или производным ПЭГ в виде альдегида, в условиях, при которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления пегилирование осуществляется посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «полиэтиленгликоль» охватывает любые формы ПЭГ, которые применяли для дериватизации других белков, как, например, моно-(C1-C10)-алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. Согласно некоторым вариантам осуществления подлежащее пегилированию антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области, и их можно применять для описанных в настоящем документе антител к МІСА/В. См., например, EP 0154316 Nishimura *et al.* и EP 0401384 Ishikawa *et al.*

IV. Физические свойства антитела

[0255] Антитела к МІСА/В, например, описанные в настоящем документе, обладают некоторыми или всеми из физических характеристик описанных в настоящем документе специфических антител к МІСА/В, такими как характеристики, описанные в Примерах.

[0256] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельной области либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут обуславливать повышенную иммуногенность антитела или изменение рК антитела вследствие измененных свойств связывания антигена (Marshall *et al.*, (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.*, (1988) *J Exp Med* 168: 1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.*, (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.*, (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях антитело к МІСА/В не предусматривает гликозилирование в вариабельной области. Это может быть достигнуто либо путем отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельной области, либо путем мутирования остатков в пределах области гликозилирования.

[0257] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В не содержат сайты изомерии по аспарагину.

Дезамидирование аспарагина может происходить в последовательностях N-G или D-G, и оно приводит к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который привносит изгиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

[0258] Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая обычно находится в диапазоне pH от 6 до 9,5. pI для IgG1-антитела, как правило, находится в пределах диапазона pH 7-9,5, а pI для IgG4-антитела, как правило, находится в пределах диапазона pH 6-8. Предполагается, что антитела с pI за пределами нормального диапазона могут подвергаться некоторому разворачиванию и характеризоваться нестабильностью в условиях *in vivo*. Таким образом, антитело к MICA/B может характеризоваться значением pI, находящимся в пределах нормального диапазона. Это может быть достигнуто либо путем отбора антител с pI в пределах нормального диапазона, либо мутирования заряженных поверхностных остатков.

[0259] Каждое антитело будет характеризоваться специфической температурой плавления, причем более высокая температура плавления указывает на более высокую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). В целом, T_mi (температура первичного разворачивания) может превышать 60°C, 65°C или 70°C. Температуру плавления антитела можно измерять с применением дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen *et al.*, (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando *et al.*, (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или спектроскопии кругового дихроизма (Murray *et al.*, (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

[0260] Согласно некоторым вариантам осуществления отбирают антитела, которые не подвергаются быстрому разрушению. Разрушение антитела можно измерять с применением капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

[0261] Согласно некоторым вариантам осуществления отбирают антитела, которые характеризуются минимальными эффектами агрегации, которые могут приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или обуславливать измененные или неблагоприятные фармакокинетические свойства. В целом, приемлемыми являются антитела со степенью агрегации 25% или меньше, 20% или меньше, 15% или меньше, 10% или меньше или 5% или меньше. Агрегацию можно измерять с помощью нескольких методик, включая эксклюзионную хроматографию на колонке (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) и метод светорассеяния. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела характеризуются требуемой растворимостью, например, растворимостью, которая обеспечивает возможность коммерческого производства. Согласно некоторым вариантам осуществления растворимость описанных в настоящем

документе антител составляла по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 60 мг/мл или по меньшей мере 70 мг/мл при нейтральном или слабокислом pH.

[0262] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются более высокой стабильностью, чем эталонное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются более высокой температурой плавления, чем эталонное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются более низкой склонностью к агрегации, чем эталонное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются более высокой растворимостью, чем эталонное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются более высокой скоростью абсорбции, более низкой токсичностью, более высокой биологической активностью и/или избирательностью в отношении мишени, лучшей выполнимостью в производстве и/или более низкой иммуногенностью, чем эталонное антитело. Эталонное антитело может представлять собой другое антитело или его фрагменты, или его конъюгат, которые связываются с MICA/B.

V. Способы конструирования антител

[0263] Как обсуждалось выше, антитела к MICA/B с раскрытыми в настоящем документе последовательностями VH и VL можно применять для создания новых антител к MICA/B путем модифицирования последовательностей VH и/или VL или присоединенной(-ых) к ним константной(-ых) области(-ей). Таким образом, согласно другому описанному в настоящем документе аспекту структурные признаки описанного в настоящем документе антитела к MICA/B применяют для создания подобных по структуре антител к MICA/B, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство описанных в настоящем документе антител к MICA/B, как, например, связывание с MICA/B человека и MICA/B яванского макака. Например, одну или несколько CDR-областей MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2 можно комбинировать рекомбинантным путем с известными каркасными областями и/или другими CDR для создания дополнительных, сконструированных рекомбинантным путем, описанных в настоящем документе антител к MICA/B, как обсуждалось выше. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования является одна или несколько из последовательностей VH и/или VL,

предусмотренных в настоящем документе, или их одна или несколько CDR-областей. Для создания сконструированного антитела нет необходимости в фактическом получении (т. е. экспрессии в виде белка) антитела с одной или несколькими из последовательностей VH и/или VL, предусмотренных в настоящем документе, или их одной или несколькими CDR-областями. Вместо этого, содержащуюся в последовательности(-ях) информацию применяют в качестве исходного материала для создания последовательности(-ей) «второго поколения», происходящей(-их) из исходной последовательности(-ей), а затем получают последовательность(-и) «второго поколения» и экспрессируют ее(их) в виде белка.

[0264] Следовательно, в настоящем документе представлены способы получения описанного в настоящем документе антитела к MICA/B.

[0265] Измененное антитело может характеризоваться по меньшей мере одним из функциональных свойств, изложенных в настоящем документе. Функциональные свойства измененных антител можно оценивать с применением стандартных анализов, доступных в данной области и/или описанных в настоящем документе, таких как изложенные в примерах (например, форматы ELISA, FACS).

[0266] Согласно некоторым вариантам осуществления способов конструирования описанных в настоящем документе антител к MICA/B мутации можно вводить случайным образом или избирательно вдоль всей или части последовательности, кодирующей антитело к MICA/B, и полученные модифицированные антитела к MICA/B можно подвергать скринингу в отношении активности связывания и/или других функциональных свойств, описанных в настоящем документе. Способы введения мутаций описаны в данной области. Например, в публикации согласно PCT WO 02/092780 Short описаны способы создания и скрининга мутаций антител с применением насыщающего мутагенеза, искусственной сборки на основе лигирования или их комбинации. В качестве альтернативы, в публикации согласно PCT WO 03/074679 Lazar *et al.* описаны способы применения компьютерных способов скрининга для оптимизации физиохимических свойств антител.

VI. Молекулы нуклеиновых кислот

[0267] Другой описанный в настоящем документе аспект относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют описанные в настоящем документе антитела к MICA/B. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «оказывается практически чистой» при очистке от других клеточных компонентов или других контаминирующих веществ, например, других нуклеиновых

кислот клетки (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая в естественных условиях связана с выделенной ДНК) или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочью/SDS, CsCl-бэ́ндинг, хроматографию на колонке, методику на основе применения ферментов рестрикции, электрофорез в агарозном геле и другие хорошо известные в данной области методики. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в настоящем документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать или может не содержать интронные последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

[0268] Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты можно получать с применением стандартных методов молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными с применением трансгенных мышей с генами иммуноглобулинов человека, как дополнительно описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученного с помощью гибридомы, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации или методов клонирования кДНК. В случае антител, полученных на основе библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с применением методик фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть выделена из такой библиотеки.

[0269] Некоторыми из описанных в настоящем документе молекул нуклеиновых кислот являются таковые, кодирующие последовательности VH и VL антител MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VH MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2, изложены в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31 и 41 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VL MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2, изложены в SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33 и 43 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности тяжелых цепей MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2, изложены в SEQ ID NO: 59, 63, 67, 71 и 75 соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности легких цепей MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2, изложены в SEQ ID NO: 61, 65, 69, 73 и 77.

[0270] Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые VH- и VL-домены антитела MICA.36, изложены как SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые тяжелые цепи антитела

MICA.36, изложены как SEQ ID NO: 59 и 131, и иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую легкую цепь антитела MICA.36, изложена как SEQ ID NO: 61.

[0271] Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые VH- и VL-домены антитела MICA.52, изложены как SEQ ID NO: 11 и 13 соответственно. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые тяжелые цепи антитела MICA.52, изложены как SEQ ID NO: 63, и иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую легкую цепь антитела MICA.52, изложена как SEQ ID NO: 65.

[0272] Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые VH- и VL-домены антитела MICA.54, изложены как SEQ ID NO: 21 и 23 соответственно. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые тяжелые цепи антитела MICA.54, изложены как SEQ ID NO: 67, и иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую легкую цепь антитела MICA.54, изложена как SEQ ID NO: 69.

[0273] Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые VH- и VL-домены антитела MICA.2, изложены как SEQ ID NO: 31 и 33 соответственно. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые тяжелые цепи антитела MICA.2, изложены как SEQ ID NO: 71, и иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую легкую цепь антитела MICA.2, изложена как SEQ ID NO: 73.

[0274] Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые VH- и VL-домены антитела 71C2, изложены как SEQ ID NO: 41 и 43 соответственно. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелые тяжелые цепи антитела 71C2, изложены как SEQ ID NO: 75, и иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую легкую цепь антитела 71C2, изложена как SEQ ID NO: 77.

[0275] Вышеупомянутые иллюстративные нуклеиновые кислоты могут дополнительно включать сигнальный пептид, изложенный в SEQ ID NO: 100-105. Нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальные пептиды, изложены как SEQ ID NO: 106-107. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнальный пептид содержит MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105).

[0276] Описанные в настоящем документе молекулы нуклеиновых кислот можно модифицировать с целью удаления конкретных последовательностей, например, последовательностей распознавания для ферментов рестрикции, или с целью оптимизации кодонов.

[0277] Способ получения MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2 может предусматривать обеспечение экспрессии тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи с сигнальным пептидом, например, в случае MICA.36, SEQ ID NO: 59 и 61 соответственно

или SEQ ID NO: 131 и 61 соответственно. Способ получения MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2 может предусматривать обеспечение экспрессии тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи с сигнальным пептидом. Клетки-хозяева, содержащие такие нуклеотидные последовательности, охвачены настоящим документом.

[0278] После получения ДНК-фрагментов, кодирующих VH- и VL-сегменты, с такими ДНК-фрагментами дальше можно проводить манипуляции с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК, например, с целью преобразования генов варибельной области в гены полноразмерных цепей антитела, гены Fab-фрагмента или ген scFv. При таких манипуляциях VL- или VH-кодирующий ДНК-фрагмент функционально связывают с другим ДНК-фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Подразумевается, что термин «функционально связанный» в данном контексте означает, что два ДНК-фрагмента соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя ДНК-фрагментами, остаются внутри рамки считывания.

[0279] Выделенную ДНК, кодирующую VH-область, можно преобразовать в ген полноразмерной тяжелой цепи за счет функционального связывания VH-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, Министерство здравоохранения и социальных служб США, публикация NIH № 91-3242), и ДНК-фрагменты, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, область IgG1. В случае гена тяжелой цепи в пределах Fab-фрагмента VH-кодирующая ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

[0280] Выделенную ДНК, кодирующую VL-область, можно преобразовать в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи в пределах Fab) за счет функционального связывания VL-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, Министерство здравоохранения и социальных служб США, публикация NIH № 91-3242), и ДНК-фрагменты, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью

стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или лямбда-цепей.

[0281] Для создания гена scFv, VH- и VL-кодирующие ДНК-фрагменты функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃, вследствие чего последовательности VH и VL могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, с VL- и VH-областями, соединенными с помощью гибкого линкера (см. например, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

[0282] Также в настоящем документе представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности VH и VL, которые являются гомологичными последовательностям антител MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2. Иллюстративные молекулы нуклеиновых кислот кодируют последовательности VH и VL, которые по меньшей мере на 70% идентичны, например, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим последовательности VH и VL антител MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2. Также в настоящем документе представлены молекулы нуклеиновых кислот с консервативными заменами (т. е. заменами, которые не изменяют полученную аминокислотную последовательность после трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

[0283] Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие VH- и/или VL-области антител к MICA/B, таких как описанные в настоящем документе антитела к MICA/B, при этом нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, кодирующих VH- и/или VL-области описанных в настоящем документе антител к MICA/B.

[0284] Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь и/или легкую цепь антител к MICA/B, таких как описанные в настоящем документе антитела к MICA/B, при этом нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи описанных в настоящем документе антител к MICA/B.

VII. Получение антител

[0285] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В можно получать с применением ряда известных методик, таких как стандартная методика гибридизации соматических клеток, описанная Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в целом, также можно использовать другие методики получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, методику фагового дисплея с применением библиотек генов антител человека.

[0286] Предпочтительной системой с использованием животного для получения гибридом является система с использованием мыши. Получение гибридомы у мыши является очень хорошо отработанной процедурой. Протоколы по иммунизации и методики выделения иммунных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры по слиянию (например, миеломные клетки мыши) и процедуры слияния также известны.

[0287] Описанные в настоящем документе химерные или гуманизированные антитела к МІСА/В можно получать на основе последовательности моноклонального антитела мыши, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую иммуноглобулины с тяжелыми и легкими цепями, можно получить из представляющей интерес мышью гибридомы и сконструировать так, чтобы она содержала последовательности иммуноглобулинов, отличные от мышинных (например, человека), с применением стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела переменные области мыши можно связывать с константными областями человека с применением способов, известных в данной области (см., например, заявку на выдачу патента США № 4816567, Cabilly *et al.*). Для создания гуманизированного антитела CDR-области мыши можно вставлять в каркасную область человека с применением способов, известных в данной области (см., например, заявку на выдачу патента США № 5225539, Winter, и заявки на выдачу патента США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, Queen *et al.*).

[0288] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против МІСА/В, можно получать с применением трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих элементы иммунной системы человека, а не системы мыши. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в настоящем документе мышами HuMAb и мышами KM соответственно, и в совокупности называемых в настоящем документе «мышами с Ig человека».

[0289] Мышь HUMAB[®] (HUMAB-MOUSE[®]) (Medarex, Inc.) имеет минилокусы генов иммуноглобулинов человека, которые кодируют неперестроенные последовательности тяжелых (μ - и γ -) и легких к-цепей иммуноглобулина человека, вместе с адресованными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и к-цепи (см., например, Lonberg, *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Следовательно, мыши характеризуются сниженным уровнем экспрессия IgM или к мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены, кодирующие тяжелые и легкие цепи человека, подвергаются процессу переключения класса и соматической мутации с образованием высокоаффинного моноклонального IgGк человека (Lonberg, N. *et al.* (1994), выше; рассмотрено в Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение мышей HuMab и геномные модификации, имеющие место у таких мышей, дополнительно описаны в Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.*, (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; и Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. См. дополнительно заявки на выдачу патента США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все Lonberg and Kay; заявку на выдачу патента США № 5545807, Surani *et al.*; публикацию согласно PCT №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все Lonberg and Kay; и публикацию согласно PCT № WO 01/14424, Korman *et al.*

[0290] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к MICA/B получают с применением мыши, которая несет последовательности иммуноглобулинов человека в трансгенах и трансхромосомах, как, например, мыши, которая несет трансген, кодирующий тяжелую цепь человека, и трансхромосому, несущую ген легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе «мышами КМ», подробно описаны в публикации согласно PCT WO 02/43478 под авторством Ishida *et al.*

[0291] Более того, альтернативные системы с использованием трансгенных животных для экспрессии генов иммуноглобулинов человека доступны в данной области, и их можно применять для получения описанных в настоящем документе антител к MICA/B. Например, можно применять альтернативную трансгенную систему, называемую

Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в заявках на выдачу патента США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, Kucherlapati *et al.*

[0292] Более того, альтернативные системы с использованием трансхромосомных животных для экспрессии генов иммуноглобулинов человека доступны в данной области, и их можно применять для получения описанных в настоящем документе антител к MICA/B. Например, можно применять мышей, несущих как трансхромосому, несущую ген тяжелой цепи человека, так и трансхромосому, несущую ген легкой цепи человека, называемых «мышами ТС»; такие мыши описаны в Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, в данной области были описаны коровы, несущие трансхромосомы, несущие гены тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), и их можно применять для получения описанных в настоящем документе антител к MICA/B.

[0293] Дополнительные мышинные системы, описанные в данной области для получения антител человека, например, антител человека к MICA/B, включают (i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой эндогенные вариабельные области тяжелой и легкой цепей мыши были замещены, посредством гомологичной рекомбинации, вариабельными областями тяжелой и легкой цепей человека, которые были функционально связаны с эндогенными константными областями мыши, благодаря чему у мышей получают химерные антитела (V человека/C мыши), а затем преобразовывают в полностью человеческие антитела с применением стандартных методик рекомбинантных ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), при этом мышь несет неперестроенные вариабельные области тяжелой цепи человека, но одну перестроенную вариабельную область общей легкой цепи человека. Такие мыши, и их применение для получения антител, описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

[0294] Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека к MICA/B также могут быть получены с применением способов на основе фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы на основе фагового дисплея для выделения антител человека являются устоявшимися в данной области. См., например: заявки на выдачу патента США №№ 5223409; 5403484 и 5571698, Ladner *et al.*; заявки на выдачу патента США №№ 5427908 и 5580717, Dower *et al.*; заявки на выдачу патента США №№ 5969108 и 6172197, McCafferty *et al.*; и заявки на выдачу патента США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, Griffiths *et al.*

[0295] Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека к МІСА/В также можно получать с применением мышей SCID, у которых были реконструированы иммунные клетки человека, вследствие чего в ответ на иммунизацию может происходить образование антител человека. Такие мыши описаны, например, в заявках на выдачу патента США №№ 5476996 и 5698767, Wilson *et al.*

VII.A. Иммунизации

[0296] Для получения полностью человеческих антител к МІСА/В трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих гены иммуноглобулинов человека (например, мышей HCol2, HCo7 или KM), можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом на основе антигена МІСА/В человека, например, МІСА*002, МІСА*004, МІСА*008, МІСА*009, МІСВ*005 или любой их комбинации, и/или клетками, экспрессирующими МІСА или его фрагмент, как описано для других антигенов, например, Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 и WO 98/24884. В качестве альтернативы, мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей МІСА/В человека или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления возраст мышей может составлять 6-16 недель после первой инфузии. Например, для иммунизации мышей HuMAb внутрибрюшинно можно применять очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) на основе рекомбинантного антигена МІСА/В. В том случае, когда в результате иммунизаций с применением очищенного или обогащенного препарата на основе антигена МІСА/В антитела не образуются, для стимуляции иммунных ответов мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими МІСА/В, например, из клеточной линии. Иллюстративные клеточные линии включают сверхэкспрессирующие МІСА/В стабильные клеточные линии CHO и Raji.

[0297] Накопленный опыт с различными антигенами показал, что у трансгенных мышей HuMAb наилучший ответ наблюдается, когда начальную иммунизацию проводят внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном в адъюванте Рибидина, с последующими IP/SC иммунизациями (всего до 10) антигеном в адъюванте Рибидина каждую неделю. Иммунный ответ можно отслеживать в процессе выполнения протокола иммунизации с применением образцов плазмы крови, полученных путем заборов крови из ретроорбитального синуса. Плазму крови можно подвергать скринингу с помощью ELISA и FACS (как описано ниже), и мышей с достаточными титрами иммуноглобулина человека к МІСА/В можно применять для процедур слияния. Мышей можно подвергать повторной стимуляции антигеном внутривенно за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что может потребоваться выполнить 2-3 процедуры слияния для каждой иммунизации. Для каждого антигена, как правило, иммунизируют от 6

до 24 мышей. Обычно применяют штаммы HCo7, HCol2 и KM. Кроме того, обе трансгенные мыши HCo7 и HCol2 могут быть скрещены с получением одной мыши с двумя разными трансгенами, кодирующими тяжелые цепи человека (HCo7/HCol2).

VII.B. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к MICA/B

[0298] Для получения гибридом, продуцирующих описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека к MICA/B, у иммунизированных мышей можно выделять спленоциты и/или клетки лимфатического узла и сливать их с подходящей бессмертной клеточной линией, такой как клеточная линия миеломы мыши. Полученные гибридомы можно подвергать скринингу на предмет продукции антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей можно сливать с несекретирующими клетками миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) с использованием ПЭГ. Клетки можно высевать в микротитрационный планшет с лунками с плоским дном с последующей инкубацией в среде для селекции. Спустя несколько недель клетки можно культивировать в питательной среде. Отдельные лунки затем можно подвергать скринингу с помощью ELISA на предмет наличия моноклональных IgM- и IgG-антител человека. После начала интенсивного роста гибридомы среду можно исследовать, обычно через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, можно пересевать, снова подвергать скринингу и, если они все еще положительные в отношении продукции моноклональных IgG-антител человека, можно субклонировать по меньшей мере дважды методом серийных разведений. Стабильные субклоны затем можно культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антитела в среде для культивирования тканей с целью определения его характеристик.

[0299] Для очистки моноклональных антител человека отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием белка A, иммобилизованного на сефарозе (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG можно проверять с использованием гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для подтверждения чистоты. Буферный раствор можно заменять на PBS, и концентрацию можно определять по OD280 с применением коэффициента экстинкции 1.43. Моноклональные антитела можно разделять на аликвоты и хранить.

VII.C. Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к МІСА/В

[0300] Антитела можно получать в клетке-хозяине в виде трансфектомы с применением, например, комбинации методик рекомбинантных ДНК и способов генной трансфекции, как известно в данной области (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

[0301] Например, для экспрессии антител или фрагментов антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификации или клонирования кДНК с применением гибридомы, которая экспрессирует представляющее интерес антитело), и указанные ДНК можно вставлять в векторы экспрессии так, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. Подразумевается, что в данном контексте термин «функционально связанный» означает, что ген антитела лигируют в вектор так, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в пределах вектора выполняют свойственную им функцию регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с применяемой клеткой-хозяином, предназначенной для экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно вставлять в отдельные векторы или оба гена вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела вставляют в вектор(-ы) экспрессии с помощью стандартных способов (например, лигирования по комплементарным сайтам рестрикции фрагмента гена антитела и вектора или лигирования по тупым концам, в случае если сайты рестрикции отсутствуют). Последовательности, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей описанных в настоящем документе антител к МІСА/В можно применять для создания полноразмерных генов антител любого изотипа антител путем вставки их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи требуемого изотипа, так, чтобы V_H-сегмент был функционально связан с C_H-сегментом(-ами) в пределах вектора, а V_L-сегмент был функционально связан с C_L-сегментом в пределах вектора.

[0302] Кроме того, или в качестве альтернативы, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, чтобы сигнальный пептид был связан внутри рамки считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид

иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т. е. сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

[0303] Согласно некоторым вариантам осуществления можно применять следующие сигнальные пептиды тяжелых и легких цепей антитела человека: MDWTWRVFCLLAVAPGAHS (SEQ ID NO: 100); МЕТРАQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO: 101); МКНЛWFFLLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 102); МЕFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 103); MDMRVPAQLLGLLLWLPGARС (SEQ ID NO: 104) или MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105). Согласно некоторым вариантам осуществления сигнальная последовательность, применяемая для экспрессии любых из описанных в настоящем документе антител к МІСА/В, представляет собой SEQ ID NO: 105. Тяжелые и легкие цепи антител к МІСА/В могут быть экспрессированы с соответствующей сигнальной последовательностью, которая была связана с каждой цепью в гибридоме, из которой они были клонированы. Ниже представлены сигнальные последовательности различных антител к МІСА/В, присутствующих в гибридоме, из которой они были клонированы, причем сигнальные последовательности можно применять для экспрессии аналогичного антитела или другого антитела:

[0304] Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелые и легкие цепи антител к МІСА/В (например, МІСА.36) могут быть сконструированы с сигнальными последовательностями, которые отличаются от таковых, присутствующих в гибридомах, из которых они были клонированы. Примеры таких последовательностей включают без ограничения следующее:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты сигнальной последовательности для тяжелой цепи:

ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCA (SEQ ID NO: 106)

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты сигнальной последовательности для легкой цепи:

ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCC (SEQ ID NO: 107)

(iii) аминокислотная последовательность сигнальной последовательности для тяжелых и легких цепей: MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105).

[0305] В дополнение к генам цепей антитела, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые осуществляют контроль экспрессии генов цепей антитела в клетке-хозяине. Подразумевается, что термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы,

осуществляющие контроль экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые осуществляют контроль транскрипции или трансляции генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области будет понятно, что конструирование вектора экспрессии, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии требуемого белка и т. д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине, являющейся клеткой млекопитающего, включают вирусные элементы, которые управляют высокоэффективной экспрессией белка в клетках млекопитающих, как, например, промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основной промотор поздних генов аденовируса (AdMLP) и вируса полиомы. В качестве альтернативы, можно применять невирусные регуляторные последовательности, например, промотор гена убиквитина или промотор гена β -глобина. Более того, регуляторные элементы состоят из последовательностей из разных источников, например, промоторная система SRA, которая содержит последовательности из промотора ранних генов SV40 и длинный концевой повтор вируса Т-клеточного лейкоза человека 1 типа (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

[0306] В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген позволяет осуществлять селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все их которых под авторством Axel *et al.*). Например, как правило, селективируемый маркерный ген делает клетку-хозяина, в которую был введен вектор, резистентной к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Предпочтительные селективируемые маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr- клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией с помощью метотрексата) и неоген (для селекции с помощью G418).

[0307] Для экспрессии легких и тяжелых цепей вектор(-ы) экспрессии, кодирующий(-ие) тяжелые и легкие цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных методик. Подразумевается, что различные формы термина «трансфекция» охватывают самые различные методики, широко используемые для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например,

электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с применением DEAE-декстрана и т. д.

[0308] Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B могут быть экспрессированы либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-хозяевах, таких как клетки млекопитающих.

[0309] Определенные клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, для экспрессии рекомбинантных описанных в настоящем документе антител к MICA/B включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая dhfr- клетки CHO, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, применяемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 759:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с клетками миеломы NSO, другой системой экспрессии является система экспрессии на основе использования гена GS, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах, или, более предпочтительно, секретиции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделять из культуральной среды с применением стандартных способов очистки белка.

VIII. Иммуноконъюгаты, производные антител и методы диагностики

[0310] Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B можно применять в целях диагностики, включая тестирование образцов и *in vivo* визуализацию, и для этой цели антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с соответствующим выявляемым средством, с образованием иммуноконъюгата. В целях диагностики соответствующие средства представляют собой выявляемые метки, которые включают радиоизотопы, в случае визуализации по отношению ко всему организму, и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие метки для антител, в случае тестирования образцов.

[0311] Выявляемые метки, которые могут быть связаны с любым описанным в настоящем документе антителом к MICA/B, могут представлять собой любые метки различных типов, применяемые в настоящее время в области *in vitro* диагностики, включая метки в форме частиц, в том числе золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как I^{125} или Tc^{99} , представленные, к примеру, в комплексе с хелатирующим средством на основе пептида типа N_2S_2 , N_3S или N_4 , хромофоры, включая флуоресцентные маркеры,

люминесцентные маркеры, фосфоресцентные маркеры и т. д., а также ферментные метки, которые превращают определенный субстрат в выявляемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляют после амплификации, например, полимеразной цепной реакции. Подходящие ферментные метки включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т. д. К примеру, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, выявляемую путем определения присутствия или образования хемилюминесценции после превращения субстратов в виде соединений 1,2-диоксетана, таких как адамантилметоксифосфорилоксибензидиоксатен (AMPPD), динатрия 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1^{3,7}}декан}-4-ил)-фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или другие люминесцентные субстраты, хорошо известные специалистам в данной области, например, хелаты подходящих лантаноидов, таких как тербий(III) и европий(III). Способ выявления определяется в зависимости от выбранной метки. Проявление метки или продуктов ее реакции можно увидеть невооруженным глазом, в случае если метка пребывает в форме частиц и накапливается на соответствующих уровнях, или с применением приборов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т. д., в каждом случае в соответствии со стандартной практикой.

[0312] Согласно некоторым вариантам осуществления способы конъюгирования обеспечивают образование связей, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например, пептидные (т. е. амидные), сульфидные, (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Такие связи почти не иммуногенные и характеризуются надлежащей стабильностью в сыворотке крови (см., например, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

[0313] В зависимости от биохимической природы фрагмента и антитела можно использовать разные стратегии конъюгирования. Для случая, когда фрагмент является встречающимся в природе или рекомбинантным, размером от 50 до 500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, в которых описывается химия синтеза конъюгатов на основе белка, которым легко может следовать специалист в данной области (см., например, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). Согласно некоторым вариантам осуществления применяют реакцию малеинимидного фрагмента с цистеиновым остатком антитела или фрагмента. Она является особенно подходящей реакцией сочетания, например, в случае Fab- или Fab'-фрагмента применяемого антитела. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления выполняют присоединение к С-концу антитела или фрагмента. С-концевую

модификацию белка, например, Fab-фрагмента, можно осуществлять, как описано (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

[0314] В целом, сайт-специфическая реакция и ковалентное присоединение основываются на превращении естественной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является ортогональной по отношению к реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в редком контексте последовательности можно превращать ферментативным путем в альдегид (см. Frese, M. A., and Dierks, T., *ChemBioChem*. 10 (2009) 425-427). Также требуемую аминокислотную модификацию можно получить за счет использования специфической ферментативной реакционной способности определенных ферментов по отношению к естественной аминокислоте в контексте данной последовательности (см., например, Takі, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al.* *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; и Bordusa, F., Highlights в *Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403) применяли катализируемую протеазой реакцию образования связей C—N. Сайт-специфическая реакция и соединение с образованием ковалентной связи может обеспечиваться за счет избирательной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами.

[0315] Для обеспечения сайт-специфического соединения с образованием ковалентной связи можно применять способность N-концевого цистеина вступать в реакцию с бензонитрилами (см. Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662).

[0316] При нативном химическом лигировании также могут быть задействованы C-концевые цистеиновые остатки (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

[0317] В US6437095 B1 описан способ конъюгации, который основывается на ускоренной реакции цистеина в пределах отрезка из отрицательно заряженных аминокислот с цистеином, расположенным в пределах отрезка из положительно заряженных аминокислот.

[0318] Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или миметик пептида. В случае химического синтеза полипептида в процессе такого синтеза могут быть включены аминокислоты с ортогональной реакционной способностью (см., например, de Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Поскольку существует большое разнообразие ортогональных функциональных групп, которые могут участвовать в образовании связи, и могут быть включены в состав синтетического пептида, конъюгация такого пептида с линкером является стандартной химической реакцией.

[0319] Для получения полипептида, меченного одной меткой, конъюгат со стехиометрией 1:1 можно разделять с помощью хроматографии от других побочных продуктов конъюгации. Эту процедуру можно облегчить путем применения партнера по связыванию, меченного красителем, и заряженного линкера. С применением такого типа меченного и сильно отрицательно заряженного партнера по связыванию, конъюгированные с одной молекулой полипептиды без труда отделяют от немеченных полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку для отделения можно применять разницу в заряде и молекулярной массе. Флуоресцентный краситель может быть пригодным для очистки комплекса от несвязавшихся компонентов, например, меченной одновалентной связывающей молекулы.

[0320] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент, присоединенный к антителу к МІСА/В, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, метящего фрагмента и биологически активного фрагмента.

[0321] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В также могут быть конъюгированы с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC). Подходящие терапевтические средства включают антиметаболиты, алкилирующие средства, молекулы, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, ДНК-кросслинкеры, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасом, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназ, антибиотики и антимиотические средства. В ADC антитело и терапевтическое средство предпочтительно конъюгированы посредством расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 108), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC могут быть получены, как описано в заявках на выдачу патента США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; публикациях согласно РСТ WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; патентных публикациях США 20060024317; 20060004081 и 20060247295.

[0322] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из цитотоксина, лекарственного средства, не являющегося цитотоксическим, радиоактивного вещества, второго антитела, фермента, антинеопластического средства и любой их комбинации.

[0323] Согласно некоторым вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и цитотоксин. Цитотоксин может быть выбран из любого известного в

данной области цитотоксина. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксин выбран из группы, состоящей из доластатина, монометилауристатина Е (ММАЕ), майтанзина, дуокармицина, калихеамицина, пирролобензодиазепина, дуокармицина, центанамицина, SN38, доксорубицина, их производного, их синтетического аналога и любой их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и цитотоксин А. Согласно другим вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и лекарственное средство, не являющееся цитотоксическим.

[0324] Согласно некоторым вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и радиоактивное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления радиоактивное вещество представляет собой радионуклид. Согласно определенным вариантам осуществления радиоактивное вещество включает радиоактивный йод. Согласно конкретным вариантам осуществления радиоактивное вещество включает ¹³¹-йод. Согласно другим вариантам осуществления радиоактивное вещество включает радиоактивный изотоп иттрия-90.

[0325] Согласно некоторым вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и второе антитело. Второе антитело может представлять собой любое описанное в настоящем раскрытии антитело, включая без ограничения антитело, которое специфически связывает белок, выбранный из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-2, IL-8, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, VISTA, CD96, CD27, GITR и любой их комбинации. Согласно одному варианту осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и антитело к PD-1. Согласно другому варианту осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и ниволумаб.

[0326] Согласно одному варианту осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и пегилированный IL-2 или пегилированный IL-10.

[0327] Согласно определенным вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и фермент. Согласно некоторым вариантам осуществления фермент представляет собой глюкозооксидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления фермент представляет собой пероксидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления фермент представляет собой миелопероксидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления фермент представляет собой глюкозооксидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления фермент представляет собой пероксидазу хрена.

[0328] Согласно определенным вариантам осуществления иммуноконъюгат содержит антитело к МІСА/В и антинеопластическое средство. Антинеопластическое

средство может представлять собой любое такое средство, известное в данной области. Согласно некоторым вариантам осуществления антинеопластическое средство представляет собой эпирубицин. Согласно некоторым вариантам осуществления антинеопластическое средство представляет собой суперантиген. Согласно определенным вариантам осуществления суперантиген представляет собой стафилококковый энтеротоксин А (SEA/E-120; эстафенатокс).

[0329] Антитела к МІСА/В, например, описанные в настоящем документе антитела, также можно применять для выявления МІСА/В, такого как МІСА/В человека, например, МІСА/В человека на поверхности клетки или растворимый МІСА/В в сыворотке крови. Антитела можно применять, например, в ELISA-анализе или проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В приводят в контакт с клетками или сывороткой крови в течение промежутка времени, подходящего для того, чтобы произошло специфическое связывание, а затем добавляют реагент, например, антитело, которое позволяет выявить антитело к МІСА/В. Иллюстративные анализы представлены в Примерах. Иллюстративные способы выявления МІСА/В, например, экспрессируемого на поверхности клетки МІСА/В или растворимого МІСА/В (sMІСА/В) в образце (сыворотке крови), предусматривают (i) приведение образца в контакт с антителом к МІСА/В в течение промежутка времени, достаточного для обеспечения специфического связывания антитела к МІСА/В с МІСА/В в образце, и (2) приведение образца в контакт с реагентом для выявления, например, антителом, которое специфически связывается с антителом к МІСА/В, например, с Fc-областью антитела к МІСА/В, за счет чего обеспечивается выявление МІСА/В, связанного антителом к МІСА/В. После инкубации с антителом и/или реагентом для выявления могут быть включены стадии промывки. Антитела к МІСА/В для применения в таких способах не обязательно должны быть связаны с меткой или средствами для выявления, поскольку средство для выявления можно применять отдельно.

[0330] Другие применения антител к МІСА/В, например, в качестве монотерапии или комбинированной терапии, представлены в другом месте настоящего документа, например, в разделе, касающемся комбинированных терапевтических препаратов.

IX. Биспецифические молекулы

[0331] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В можно применять для образования биспецифических молекул. Антитело к МІСА/В или его антигенсвязывающие части можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора) с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей

мере с двумя разными центрами связывания или целевыми молекулами. Например, антитело к МСА/В можно связывать с антителом или scFv, которые специфически связываются с любыми белками, которые можно применять в качестве потенциальных мишеней для комбинированных лекарственных препаратов, такими как описанные в настоящем документе белки (например, антителами к PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGF β , IL-10, IL-2, IL-8, B7-H4, лиганду Fas, CXCR4, мезотелину, CD27, CD96, VISTA или GITR, или пегилированным IL-2 или пегилированным IL-10). Описанное в настоящем документе антитело фактически можно дериватизировать или связывать более чем с одной другой функциональной молекулой с получением полиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя разными центрами связывания и/или целевыми молекулами; подразумевается, что в контексте настоящего документа такие полиспецифические молекулы также охвачены термином «биспецифическая молекула». Для создания описанной в настоящем документе биспецифической молекулы описанное в настоящем документе антитело может быть функционально связано (например, посредством химического соединения, слияния генов, нековалентного связывания или другим образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или миметик связывания, вследствие чего образуется биспецифическая молекула.

[0332] Следовательно, в настоящем документе предусмотрены биспецифические молекулы, предусматривающие по меньшей мере одну первую специфичность связывания в отношении МСА/В и вторую специфичность связывания в отношении второго целевого эпитопа. Согласно некоторым описанным в настоящем документе вариантам осуществления, в которых биспецифическая молекула является полиспецифической, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания.

[0333] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе биспецифические молекулы предусматривают в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой их минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, как описано в Ladner *et al.*, заявка на выдачу патента США № 4946778.

[0334] Хотя предпочтительными являются моноклональные антитела человека, другими антителами, которые можно использовать в описанных в настоящем документе биспецифических молекулах, являются антитела мыши, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

[0335] Описанные в настоящем документе биспецифические молекулы можно получать путем конъюгирования составляющих элементов, обеспечивающих специфическое связывание, с применением известных в данной области способов. Например, каждый обеспечивающий специфическое связывание элемент биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Если обеспечивающие специфическое связывание элементы представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно применять ряд средств для присоединения или перекрестного связывания. Примеры средств для перекрестного связывания включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают таковые, описанные в Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Некоторыми из конъюгирующих средств являются SATA и сульфос-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

[0336] Если обеспечивающие специфическое связывание элементы представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы посредством связывания через сульфгидрильные группы С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область модифицирована так, что она содержит нечетное число сульфгидрильных остатков, предпочтительно один, до конъюгации.

[0337] В качестве альтернативы, оба обеспечивающих специфическое связывание элемента могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ является в особенности пригодным, когда биспецифическая молекула представляет собой $mAb \times mAb$, $mAb \times Fab$, $mAb \times (scFv)_2$, $Fab \times F(ab')_2$ или лиганд $\times$ слитый белок на основе Fab. Биспецифическое антитело может предусматривать антитело, содержащее scFv на С-конце каждой тяжелой цепи. Описанная в настоящем документе биспецифическая молекула может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут предусматривать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в заявке на выдачу патента США номер 5260203; заявке на

выдачу патента США номер 5455030; заявке на выдачу патента США номер 4881175; заявке на выдачу патента США номер 5132405; заявке на выдачу патента США номер 5091513; заявке на выдачу патента США номер 5476786; заявке на выдачу патента США номер 5013653; заявке на выдачу патента США номер 5258498 и заявке на выдачу патента США номер 5482858.

[0338] Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено с применением известных в данной области способов, таких как ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), FACS-анализ, биологический анализ (например, ингибирования роста) или вестерн-блот-анализ. Каждый из этих анализов в общем случае позволяет выявлять наличие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело путем использования меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса.

X. Композиции

[0339] Дополнительно предусмотрены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие одно или комбинацию антител к МІСА/В или комбинацию с антителами к другим мишеням, или их антигенсвязывающую(-ие) часть(-и), описанные в настоящем документе, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (например, двух или более других) антител, или иммуноконъюгаты, или биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе. Например, описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгаты или биспецифические молекулы), которые связываются с разными эпитопами на целевом антигене, или которые обладают дополнительными видами активности.

[0340] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит антитело к МІСА/В в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 150 мкг/мл, 200 мкг/мл, 1-300 мкг/мл или 100-300 мкг/мл.

[0341] Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также можно вводить в рамках комбинированной терапии, т. е. в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать описанное в настоящем документе антитело к МІСА/В в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым и/или иммуномодулирующим, например, стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки средством. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в рамках комбинированной терапии, описаны более детально ниже в разделе, описывающем применения описанных в настоящем документе антител к МІСА/В.

[0342] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно комбинировать по меньшей мере с одним другим средством, выбранным из химиотерапевтических лекарственных средств, низкомолекулярных лекарственных средств и антител, которые стимулируют иммунный ответ в отношении данного рака. В некоторых случаях антитело к MICA/B можно комбинировать, например, с одним или несколькими из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к OX40 (также известному как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L) (например, BMS986178 или MDX-1803), антитела к CD137, антитела к LAG-3, антитела к GITR, антитела к KIR, антитела к TGF β , антитела к IL-10, длительно действующей молекулы на основе IL-10 (например, слитой молекулы IL-10-Fc или пегилированного IL-10, такого как AM0010 ARMO BioSciences), длительно действующего IL-2 (например, молекул пегилированного IL-2, такого как NKTR-214 Nektar; см. US 8252275, WO12/065086 и WO15/125159), антитела к VISTA, антитела к CD96, антитела к IL-8, антитела к B7-H4, антитела к лиганду Fas, антитела к CXCR4, антитела к мезотелину, антитела к CD27 или любой их комбинации.

[0343] Согласно другим вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено со вторым антителом. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело специфически связывает белок, выбранный из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGF β , IL-10, IL-2, VISTA, CD96, IL-8, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CD27, GITR и любой их комбинации.

[0344] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к PD-1. Антитело к PD-1 может представлять собой любое антитело, которое связывает PD-1 и ингибирует взаимодействие PD-1 и PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой ниволумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к PD-L1. Антитело к PD-L1 может представлять собой любое антитело, которое связывает PD-L1 и ингибирует взаимодействие PD-1 и PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой атезолизумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой дурвалумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой авелумаб.

[0345] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к CTLA-4. Антитело к CTLA-4 может представлять собой любое антитело, которое связывает CTLA-4 и ингибирует его активность. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой тремелидумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой ипилидумаб.

[0346] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к LAG3. Антитело к LAG3 может представлять собой любое антитело, которое связывает LAG-3 и ингибирует его активность. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к LAG3 представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой 25F7.

[0347] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к CD137. Антитело к CD137 может представлять собой любое антитело, которое связывает CD137 и ингибирует его активность. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к CD137. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой урелумаб.

[0348] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к KIR. Антитело к KIR может представлять собой любое антитело, которое связывает KIR и ингибирует его активность. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к KIR представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к KIR. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой лирилумаб.

[0349] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к GITR. Антитело к GITR может представлять собой любое антитело, которое связывает GITR и ингибирует его активность. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к GITR представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антитело к GITR. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой MK4166. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой TRX518.

[0350] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к CD96.

[0351] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к TIM3.

[0352] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к VISTA.

[0353] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к NKG2a.

[0354] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к ICOS.

[0355] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к OX40.

[0356] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к IL8 антитело, такое как NuMax®-IL8 (BMS-986253).

[0357] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено с длительно действующей молекулой на основе IL-10. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено со слитой молекулой IL-10-Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено с пегилированным IL-10, таким как AM0010 ARMO BioSciences.

[0358] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено с длительно действующим IL-2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B может быть составлено с молекулами пегилированного IL-2, такого как NKTR-214 Nektar; см. US 8252275, WO12/065086 и WO15/125159.

[0359] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит объемообразующее средство. Объемообразующее средство может быть выбрано из группы, состоящей из NaCl, маннита, глицина, аланина и любой их комбинации. Согласно другим вариантам осуществления композиция по настоящему изобретению содержит стабилизирующее средство. Стабилизирующее средство может быть выбрано из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, рафинозы, аргинина; или любой их комбинации. Согласно другим вариантам осуществления композиция по настоящему изобретению содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20) и любой их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления композиция дополнительно содержит хелатирующее средство. Хелатирующее средство может быть выбрано из группы, состоящей из диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA),

этилендиаминтетрауксусной кислоты, нитрилотриуксусной кислоты и любой их комбинации.

[0360] Согласно другим вариантам осуществления композиция содержит третье антители. Согласно некоторым вариантам осуществления третье антители представляет собой любое раскрытое в настоящем документе антители.

[0361] Согласно одному варианту осуществления композиция дополнительно содержит NaCl, маннит, диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА), сахарозу, PS80 и любую их комбинацию.

[0362] В контексте настоящего документа «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые возможные растворители, диспергирующие среды, оболочки, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т. д., которые являются физиологически совместимыми. Согласно некоторым вариантам осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). Один из способов подкожной инъекции основан на технологии доставки лекарственных средств ENHANZE® Halozyme Therapeutics, предусматривающей применение комбинированного состава Ab с рекомбинантным ферментом гиалуронидазой человека (гHuPH20), который позволяет устранить традиционные ограничения по объему биологических препаратов и лекарственных средств, которые могут быть доставлены подкожно, из-за внеклеточного матрикса (заявка на выдачу патента США № 7767429). В зависимости от пути введения активное соединение, т. е. антители, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, могут быть покрыты слоем материала с целью защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут приводить к инактивации соединения.

[0363] Описанные в настоящем документе фармацевтические соединения могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислот включают таковые, полученные на основе нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, ортофосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т. д., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные карбоновые кислоты, гидроксикарбоновые кислоты, ароматические

кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и т. д. Соли присоединения оснований включают таковые, полученные на основе щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т. д., а также на основе нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т. д.

[0364] Описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, гидросульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. д.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. д.; и (3) хелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, ортофосфорная кислота и т. д.

[0365] Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для нанесения оболочки, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

[0366] Такие композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие вещества, эмульгирующие вещества и диспергирующие вещества. Предотвращение присутствия микроорганизмов может обеспечиваться путем применения процедур стерилизации, выше, и путем включения различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т. д. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. д. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъеклируемой фармацевтической формы может быть обеспечена за счет включения средств, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[0367] Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий для немедленного применения. Применение таких

сред и средств для фармацевтически активных веществ известны в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо общепринятые среды или средство несовместимы с активным соединением, их применение рассматривается в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях. Фармацевтическая композиция может содержать консервант или может не содержать консервант. В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

[0368] Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиции можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения оболочки, такой как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях композиции могут включать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъеклируемых композиций может быть обеспечена за счет включения в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например, однозамещенных солей стеариновой кислоты и желатина.

[0369] Стерильные инъеклируемые растворы можно получать путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов, при необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из ряда таковых, перечисленных выше в настоящем документе. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов некоторыми способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), в результате которых на выходе получают порошок активного ингредиента и любого дополнительного требуемого ингредиента из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора на их основе.

[0370] Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения единой лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подлежащего лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем

для получения единой лекарственной формы, обычно будет таким количеством композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов, это количество будет находится в диапазоне от приблизительно 0,01 процента до приблизительно девяноста девяти процентов активного ингредиента, от приблизительно 0,1 процента до приблизительно 70 процентов или от приблизительно 1 процента до приблизительно 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

[0371] Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократный болюс, несколько разделенных доз можно вводить в течение определенного периода времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно предпочтительным является составление композиций для парентерального применения в единичной лекарственной форме с целью облегчения введения и обеспечения однородности дозировки. Единичная лекарственная форма в контексте настоящего документа относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных дозировок для введения подлежащим лечению субъектам; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификации для описанных в настоящем документе единичных лекарственных форм основываются на (a) уникальных характеристиках активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничениях, специфичных для области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов, и непосредственно зависят от указанных.

[0372] В случае введения антитела к МІСА/В, например, описанного в настоящем документе, дозировка находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг. Антитело к МІСА/В можно вводить в фиксированной дозе (схема приема с фиксированной дозой). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В можно вводить в фиксированной дозе вместе с другим антителом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В вводят в дозе, рассчитанной на вес тела.

[0373] В некоторых способах два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания вводят параллельно, и в этом случае дозировка каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Антитело обычно вводят многократно. Интервалы между отдельными дозировками могут составлять, например, недели, месяца, каждые три месяца или годы. Интервалы также могут быть нерегулярными,

что определяют путем измерения у пациента уровней в крови антитела к целевому антигену. В некоторых способах дозировку корректируют для достижения концентрации антитела в плазме крови, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл, и в некоторых способах – приблизительно 25-300 мкг/мл.

[0374] Антитело к MICA/B можно вводить с другим антителом с применением режима дозирования, предназначенного для другого антитела. Например, антитело к MICA/B можно вводить с антителом к PD-1, таким как ниволумаб (OPDIVO®), каждые две недели в виде *i.v.* инфузии в течение 60 минут до момента наступления прогрессирования заболевания или возникновения неприемлемой токсичности. Антитело к MICA/B можно вводить с пембролизумабом (KEYTRUDA®) каждые 3 недели в виде *i.v.* инфузии в течение 30 минут до момента наступления прогрессирования заболевания или возникновения неприемлемой токсичности. Антитело к MICA/B можно вводить с атезолизумабом (TECENTRIQ™) каждые 3 недели в виде *i.v.* инфузии в течение 60 или 30 минут до момента наступления прогрессирования заболевания или возникновения неприемлемой токсичности.

[0375] Антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В целом, антитела человека характеризуются наиболее длительным временем полужизни, далее идут гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Дозировка и частота введения может варьироваться в зависимости от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях вводят относительно низкую дозировку с относительно нечастыми интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца жизни. При терапевтических применениях в некоторых случаях требуется введение относительно высокой дозировки с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не замедлится или не остановится, и до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациент может применять профилактический режим.

[0376] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от

ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций, описанных в настоящем документе, или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного соединения, которое будет использовано, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или вещества, применяемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и сведения о перенесенных ранее заболеваниях пациента, подлежащего лечению, и другие факторы, хорошо известные в области медицины.

[0377] «Терапевтически эффективная дозировка» описанного в настоящем документе антитела к MICA/B может обеспечивать уменьшение тяжести симптомов заболевания, повышение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждение ухудшения или утраты дееспособности вследствие поражения заболеванием. В контексте рака, терапевтически эффективная доза может обеспечивать повышение выживаемости, например, общей выживаемости, и/или предупреждение дальнейшего ухудшения физических симптомов, ассоциированных с раком. Симптомы рака хорошо известны в данной области и включают, например, нетипичные признаки родимого пятна, изменение внешнего вида родимого пятна, включая асимметрию, форму края, цвет и/или диаметр, новообразованные пигментированные участки кожи, аномальное родимое пятно, потемневшие участки под ногтем, уплотнения молочной железы, изменения соска, кисты молочной железы, боль в области молочной железы, некроз, потерю веса, слабость, переутомление, трудности с приемом пищи, потерю аппетита, хронический кашель, дыхательную недостаточность, гемопизис, кровь в моче, кровь в кале, тошноту, рвоту, метастазы в печень, метастазы в легкие, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, прободение толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвоту с кровью, гипергидроз, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстую кишку, метастазы в легкие, метастазы в мочевой пузырь, метастазы в печень, метастазы в кости, метастазы в почку и метастазы в поджелудочную железу, дисфагию и т. д.

[0378] Терапевтически эффективная доза может обеспечивать предупреждение или задержку проявления рака, что может потребоваться, например, при наличии ранних или первичных признаков заболевания. Лабораторные тесты, используемые в диагностике рака, включают химические анализы (включая измерение уровней MICA/B), анализ крови, серологическое исследование и радиологическое исследование. Следовательно, любой

клинический или биохимический анализ, который позволяет отслеживать любое из вышеперечисленного, можно применять для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака. Специалист в данной области сможет определить такие количества основываясь на таких факторах, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная композиция или выбранный путь введения.

[0379] Описанную в настоящем документе композицию можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с применением одного или нескольких из ряда известных в данной области способов. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Пути введения для описанных в настоящем документе антител к МІСА/В могут включать внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в контексте настоящего документа означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

[0380] В качестве альтернативы, описанное в настоящем документе антитело потенциально могло бы вводиться путем, отличным от парентерального, как, например, посредством местного, эпидермального или мукозального пути введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

[0381] Активные соединения можно готовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в случае состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биологически совместимые полимеры, такие как сополимер этилена и винилацетата, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Множество способов приготовления таких составов являются запатентованными или обычно известными специалистам в данной области. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0382] Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских изделий, известных в данной области. Например, согласно некоторым вариантам осуществления описанную в настоящем документе терапевтическую композицию можно вводить с помощью безыгольного инъектора для подкожных инъекций, как, например, инъекторов, раскрытых в заявках на выдачу патента США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры для хорошо известных имплантатов и модулей для применения с описанными в настоящем документе антителами к МІСА/В включают: заявку на выдачу патента США № 4487603, в которой раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для вливания лекарственного препарата с контролируемой скоростью; заявку на выдачу патента США № 4486194, в которой раскрыто терапевтическое изделие для введения лекарственных препаратов через кожу; заявку на выдачу патента США № 4447233, в которой раскрыт инфузионный насос для вливания лекарственного препарата для доставки лекарственного препарата с точно заданной скоростью инфузии; заявку на выдачу патента США № 4447224, в которой раскрыта имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для продолжительной доставки лекарственного средства; заявку на выдачу патента США № 4439196, в которой раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отделениями; и заявку на выдачу патента США № 4475196, в которой раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти заявки на выдачу патента включены в настоящий документ посредством ссылки. Множество прочих подобных имплантатов, систем доставки и модулей известны специалистам в данной области.

[0383] Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В можно составлять так, чтобы обеспечивалось надлежащее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие соединения с высокой степенью гидрофильности. Для обеспечения того, чтобы описанные в настоящем документе терапевтические соединения пересекали ГЭБ (если требуется, например, в случае злокачественных опухолей головного мозга), их можно составлять, например, в липосомы. Касательно способов получения липосом, см., например, заявки на выдачу патента США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одно или несколько веществ, которые избирательно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым усиливая целевую доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие вещества включают соль фолиевой кислоты или биотин (см., например, заявку на выдачу патента США 5416016, Low *et al.*); маннозиды (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); антитела (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.*

357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); рецептор поверхностно-активного белка A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

XI. Применения и способы

[0384] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу лечения субъекта, предусматривающему введение субъекту раскрытого в настоящем документе антитела к МІСА/В, полинуклеотида, кодирующего антитело к МІСА/В, вектора, содержащего полинуклеотид, клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, иммуноконъюгата, содержащего антитело к МІСА/В, или любой их комбинации.

[0385] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции (например, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или фармацевтической композиции). Согласно другим аспектам настоящее раскрытие относится к способу ингибирования сбрасывания МІСА/В опухолевой клеткой у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно другим аспектам настоящее раскрытие относится к способу снижения уровня сбрасываемого МІСА/В в сыворотке крови и/или сохранения МІСА/В на поверхности клетки у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно другим аспектам настоящее раскрытие относится к способу уничтожения опухолевой клетки у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно другим аспектам настоящее раскрытие относится к способу уменьшения размера опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно другим вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу ингибирования метастазирования опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективной дозы раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек.

[0386] Композиции по настоящему раскрытию можно вводить с применением любого фармацевтически приемлемого пути. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию (например, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин,

иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция) вводят внутривенно, внутривентриально, внутримышечно, внутриартериально, интратекально, внутривентрикулярно, внутривентрикулярно, интракапсулярно, интраорбитально, внутрисердечно, внутрикожно, транстрахеально, подкожно, субкутикулярно, внутрисуставно, субкапсулярно, субарахноидально, интраспинально, эпидурально, интратернально, местно, эпидермально, мукозально или с применением любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят подкожно.

[0387] Согласно определенным вариантам осуществления способ обеспечивает уменьшение размера злокачественного новообразования, например, размера опухоли, у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления размер злокачественного новообразования уменьшается по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80% или по меньшей мере на приблизительно 90%.

[0388] Согласно некоторым вариантам осуществления способ обеспечивает повышение общей выживаемости субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления общая выживаемость повышается относительно средней общей выживаемости субъекта с таким же типом рака, но получавшим лечение с применением другой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления общая выживаемость повышается по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере в приблизительно 2 раза, по меньшей мере в приблизительно 3 раза, по меньшей мере в приблизительно 5 раз. Согласно некоторым вариантам осуществления общая выживаемость повышается по меньшей мере на приблизительно один месяц, по меньшей мере на приблизительно 2 месяца, по меньшей мере на приблизительно 3 месяца, по меньшей мере на приблизительно 4 месяца, по меньшей мере на приблизительно 5 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 7 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 8 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 9 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 10 месяцев, по меньшей мере

мере на приблизительно 11 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 21 месяц, по меньшей мере на приблизительно 2 года, по меньшей мере на приблизительно 3 года, по меньшей мере на приблизительно 4 года, по меньшей мере на приблизительно 5 лет или по меньшей мере на приблизительно 10 лет.

[0389] Согласно некоторым вариантам осуществления способ обеспечивает у субъекта повышение выживаемости без прогрессирования. Согласно некоторым вариантам осуществления общая выживаемость повышается относительно средней выживаемости без прогрессирования у субъекта с таким же типом рака, но получавшего лечение с применением другой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления выживаемость без прогрессирования повышается по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере в приблизительно 2 раза, по меньшей мере в приблизительно 3 раза, по меньшей мере в приблизительно 5 раз. Согласно некоторым вариантам осуществления общая выживаемость повышается по меньшей мере на приблизительно один месяц, по меньшей мере на приблизительно 2 месяца, по меньшей мере на приблизительно 3 месяца, по меньшей мере на приблизительно 4 месяца, по меньшей мере на приблизительно 5 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 7 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 8 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 9 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 10 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 11 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере на приблизительно 21 месяц, по меньшей мере на приблизительно 2 года, по меньшей мере на приблизительно 3 года, по меньшей мере на приблизительно 4 года, по меньшей мере на приблизительно 5 лет или по меньшей мере на приблизительно 10 лет.

[0390] Согласно некоторым вариантам осуществления способ обеспечивает повышение у субъекта частоты объективных ответов. Согласно определенным вариантам осуществления способ обеспечивает индукцию полного ответа у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способ обеспечивает индукцию частичного ответа у субъекта.

[0391] Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает применение раскрытого в настоящем документе антитела к MICA/B (или полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или иммуноконъюгата) и второго средства терапии. Согласно некоторым

вариантам осуществления второе средство терапии применяют до применения антитела к МІСА/В. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии применяют после применения антитела к МІСА/В. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии применяют одновременно с антителом к МІСА/В. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к МІСА/В и второе средство терапии применяют отдельно. Согласно другим вариантам осуществления антитело к МІСА/В и второе средство терапии вводят в одном составе.

[0392] Второе средство терапии может представлять собой любое другое известное в данной области средство терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии включает иммунотерапию. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии включает химиотерапию. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает лучевую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает хирургическое вмешательство. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает введение второго терапевтического средства.

[0393] Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство содержит второе антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления второе терапевтическое средство содержит эффективное количество антитела, которое специфически связывает белок, выбранный из индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A, CD27, глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка (GITR) и медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM), белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганда 1 белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1), CTLA-4, В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного белка 3, содержащего иммуноглобулиновый и муциновый домен (TIM-3), белка, кодируемого геном 3 активации лимфоцитов (LAG-3), рецептора A2a аденозина (A2aR), лектин-подобного рецептора G1 клеток-киллеров (KLRG-1), рецептора 2B4 естественных клеток-киллеров (CD244), CD160, Т-клеточного иммунорецептора с Ig- и ITIM-доменами (TIGIT) и рецептора супрессора активации Т-клеток, содержащего IgV-подобный домен (VISTA), NKG2a, KIR, TGF β , IL-10, IL-8, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CEACAM-1, CD96, CD52, HER2 и любой их комбинации.

XI.A. Антитела к PD-1

[0394] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к PD-1. Известные в данной области антитела к PD-1 можно применять в описанных в настоящем изобретении композициях и способах. Различные моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с PD-1 с высокой

аффинностью, были раскрыты в заявке на выдачу патента США № 8008449. Было продемонстрировано, что раскрытые в заявке на выдачу патента США № 8008449 антитела человека к PD-1 проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (a) связываются с PD-1 человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше, как определено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса с применением биосенсорной системы Biacore; (b) практически не связываются с CD28, CTLA-4 или ICOS человека; (c) повышают пролиферацию Т-клеток в анализе на основе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (d) повышают продукцию интерферона- γ в MLR-анализе; (e) повышают степень секреции IL-2 в MLR-анализе; (f) связываются с PD-1 человека и PD-1 яванского макака; (g) ингибируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1; (h) стимулируют антигенспецифические вторичные иммунные ответы; (i) стимулируют гуморальные иммунные ответы; и (j) ингибируют рост опухолевых клеток *in vivo*. Используемые в настоящем изобретении антитела к PD-1 включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и проявляют по меньшей мере одну, согласно некоторым вариантам осуществления, по меньшей мере пять из упомянутых выше характеристик.

[0395] Другие моноклональные антитела к PD-1 были описаны, например, в заявках на выдачу патента США №№ 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, публикации заявки на патент США № 2016/0272708 и публикациях согласно РСТ №№ WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, WO 2017/19846, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте.

[0396] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба (также известного как OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538), пембролизумаба (Merck; также известного как KEYTRUDA®, ламбролизумаба и MK-3475; см. WO2008/156712), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; также известного как AMP-514; см. WO 2012/145493), цемиплимаба (Regeneron; также известного как REGN-2810; см. WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; см. Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; см. WO 2015/35606 и US 2015/0079109), INC5HR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; также известного как SHR-1210; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu et al., *J.*

Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), TSR-042 (Tesaro Biopharmaceutical, также известного как ANB011; см. WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals, также известного как WBP3055; см. Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790), MGA012 (MacroGenics, см. WO 2017/19846) и IBI308 (Innovent; см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540).

[0397] Согласно одному варианту осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа PD-1 в виде полностью человеческого IgG4-антитела (S228P), которое избирательно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), тем самым блокируя подавление противоопухолевых функций Т-клеток (заявка на выдачу патента США № 8008449; Wang et al., 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56).

[0398] Согласно другому варианту осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное IgG4-антитело (S228P), направленное против рецептора клеточной поверхности PD-1 человека (белок 1 запрограммированной гибели или белок 1 запрограммированной гибели клеток). Пембролизумаб описан, например, в заявках на выдачу патента США №№ 8354509 и 8900587.

[0399] Используемые в раскрытых композициях и способах антитела к PD-1 также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека с любым раскрытым в настоящем документе антителом к PD-1, например, ниволумабом (см., например, заявку на выдачу патента США № 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 связывает тот же эпитоп, что и любое из описанных в настоящем документе антител к PD-1, например, ниволумаб. Способность антител к перекрестному конкурентному связыванию с антигеном указывает на то, что такие моноклональные антитела связываются с той же соответствующей эпитопу областью антигена и способствуют пространственному затруднению связывания других перекрестно конкурирующих антител с такой конкретной соответствующей эпитопу областью. Ожидается, что такие перекрестно конкурирующие антитела обладают функциональными свойствами, очень похожими с таковыми эталонного антитела, например, ниволумаба, благодаря их связыванию с той же соответствующей эпитопу областью PD-1. Перекрестно конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основе их способности к перекрестному конкурентному связыванию с ниволумабом в стандартных анализах связывания PD-1,

таких как анализ с применением системы Biacore, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

[0400] Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют с ниволумабом за связывание с PD-1 человека, или связываются с той же соответствующей эпитопу областью PD-1 человека, что и ниволумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям такие перекрестно конкурирующие антитела являются химерными антителами, сконструированными антителами или гуманизированными антителами или антителами человека. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или моноклональные антитела человека можно получать и выделять с помощью хорошо известных в данной области способов.

[0401] Используемые в композициях и способах по настоящему изобретению антитела к PD-1 также включают антигенсвязывающие части описанных выше антител. Было подробно продемонстрировано, что функция антитела, заключающаяся в связывании антигена, может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

[0402] Антитела к PD-1, подходящие для применения в раскрытых композициях и способах, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 и ингибируют иммуносупрессорный эффект сигнального пути с участием PD-1. В любых из раскрытых в настоящем документе композиций или способов «антитело» к PD-1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, которые связываются с рецептором PD-1 и проявляют функциональные свойства, подобные таковым полных антител, в отношении ингибирования связывания лиганда и активации иммунной системы. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ниволумабом за связывание с PD-1 человека.

XI.B. Антитела к PD-L1

[0403] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к PD-L1. Известные в данной области антитела к PD-L1 можно применять в композициях и способах по настоящему раскрытию. Примеры антител к PD-L1, пригодных в композициях и способах по настоящему раскрытию, включают антитела, раскрытые в заявке на выдачу патента США № 9580507. Было продемонстрировано, что раскрытые в заявке на выдачу патента США № 9580507 моноклональные антитела человека к PD-L1 проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (а) связываются с PD-L1 человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше, как определено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса с применением биосенсорной системы Biacore; (b) повышают пролиферацию Т-клеток в анализе на основе реакции смешанной культуры

лимфоцитов (MLR); (с) повышают продукцию интерферона- γ в MLR-анализе; (d) повышают степень секреции IL-2 в MLR-анализе; (е) стимулируют гуморальные иммунные ответы; и (f) обращают эффект регуляторных Т-клеток в отношении эффекторных Т-клеток и/или дендритных клеток. Используемые в настоящем изобретении антитела к PD-L1 включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и проявляют по меньшей мере одну, согласно некоторым вариантам осуществления, по меньшей мере пять из упомянутых выше характеристик.

[0404] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-L1 выбрано из группы, состоящей из BMS-936559 (также известного как 12A4, MDX-1105; см., например, заявку на выдачу патента США № 7943743 и WO 2013/173223), атезолизумаба (Roche; также известного как TECENTRIQ®, MPDL3280A, RG7446; см. US 8217149; см., также, Herbst et al. (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000), дурвалумаба (AstraZeneca; также известного как IMFINZI™, MEDI-4736; см. WO 2011/066389), авелумаба (Pfizer; также известного как BAVENCIO®, MSB-0010718C; см. WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; см. WO2013/181634), CX-072 (Cytomx; см. WO2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang et al., *Cell Discov.* 7:3 (March 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; см., например, WO 2017/034916) и CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik et al., AACR:Abstract 4606 (Apr 2016)).

[0405] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). Атезолизумаб представляет собой полностью гуманизированное моноклональное IgG1-антитело к PD-L1.

[0406] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI™). Дурвалумаб представляет собой моноклональное IgG1-антитело к PD-L1 с легкими каппа-цепями.

[0407] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®). Авелумаб представляет собой моноклональное IgG1-антитело к PD-L1 с легкими лямбда-цепями.

[0408] Согласно другим вариантам осуществления моноклональное антитело к PD-L1 выбрано из группы, состоящей из 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1 и любой их комбинации.

[0409] Используемые в раскрытых композициях и способах антитела к PD-L1 также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 человека с любым раскрытым в настоящем документе антителом к PD-L1, например, атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-L1 связывает тот же эпитоп, что и любое из описанных в настоящем документе антител к PD-L1,

например, атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб. Способность антител к перекрестному конкурированию за связывание с антигеном указывает на то, что такие антитела связываются с той же соответствующей эпитопу областью антигена и способствуют пространственному затруднению связывания других перекрестно конкурирующих антител с такой конкретной соответствующей эпитопу областью. Ожидается, что такие перекрестно конкурирующие антитела обладают функциональными свойствами, очень похожими с таковыми эталонного антитела, например, атезолизумаба и/или авелумаба, благодаря их связыванию с той же соответствующей эпитопу областью PD-L1. Перекрестно конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основе их способности к перекрестному конкурированию с атезолизумабом и/или авелумабом в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ с применением системы *Viacore*, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

[0410] Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют с атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом за связывание с PD-L1 человека, или связываются с той же соответствующей эпитопу областью PD-L1 человека, что и атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям такие перекрестно конкурирующие антитела являются химерными антителами, сконструированными антителами или гуманизированными антителами или антителами человека. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или моноклональные антитела человека можно получать и выделять с помощью хорошо известных в данной области способов.

[0411] Используемые в композициях и способах по настоящему изобретению антитела к PD-L1 также включают антигенсвязывающие части описанных выше антител. Было подробно продемонстрировано, что функция антитела, заключающаяся в связывании антигена, может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

[0412] Антитела к PD-L1, подходящие для применения в раскрытых композициях и способах, представляют собой антитела, которые связываются с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-1 и ингибируют иммуносупрессорный эффект сигнального пути с участием PD-1. В любых из раскрытых в настоящем документе композиций или способов «антитело» к PD-L1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, которые связываются с PD-L1 и проявляют функциональные свойства, подобные таковым полных антител, в отношении ингибирования связывания рецептора и активации иммунной системы. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающая

часть перекрестно конкурируют с атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом за связывание с PD-L1 человека.

XI.C. Антитела к CTLA-4

[0413] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к CTLA-4. Известные в данной области антитела к CTLA-4 можно применять в композициях и способах по настоящему раскрытию. Антитела к CTLA-4 по настоящему изобретению связываются с CTLA-4 человека для нарушения взаимодействия CTLA-4 с рецептором B7 человека. Поскольку взаимодействие CTLA-4 с B7 опосредует сигнальную трансдукцию, приводящую к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, усиливает или увеличивает продолжительность активации таких Т-клеток, за счет чего происходит индукция, усиление или увеличение продолжительности иммунного ответа.

[0414] Моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с CTLA-4 с высокой аффинностью, были раскрыты в заявке на выдачу патента США № 6984720. Другие моноклональные антитела к CTLA-4 были описаны, например, в заявках на выдачу патента США №№ 5977318, 6051227, 6682736 и 7034121 и международных публикациях WO 2012/122444, WO 2007/113648, WO 2016/196237 и WO 2000/037504, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Было продемонстрировано, что раскрытые в заявке на выдачу патента США № 6984720 моноклональные антитела человека к CTLA-4 проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (а) специфически связываются с CTLA-4 человека с аффинностью связывания, отражаемой в равновесной константе ассоциации (K_a) по меньшей мере приблизительно 10^7 M^{-1} , или приблизительно 10^9 M^{-1} , или от приблизительно 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} или выше, как определено с помощью анализа с применением системы Biacore; (b) кинетическая константа ассоциации (k_a) по меньшей мере приблизительно 10^3 , приблизительно 10^4 или приблизительно $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; (c) кинетическая константа диссоциации (k_d) по меньшей мере приблизительно 10^3 , приблизительно 10^4 или приблизительно $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; и (d) ингибируют связывание CTLA-4 с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Пригодные для настоящего изобретения антитела к CTLA-4 включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 человека и характеризуются по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя из вышеупомянутых характеристик.

[0415] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба (также известного как YERVOY®, MDX-010, 10D1; см. заявку на выдачу патента США № 6984720), MK-1308 (Merck), AGEN-1884

(Agenus Inc.; см. WO 2016/196237) и тремелидумаба (AstraZeneca; также известного как тицилимумаб, CP-675,206; см. WO 2000/037504 и Ribas, *Update Cancer Ther.* 2(3): 133-39 (2007)). Согласно конкретным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

[0416] Согласно конкретным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб для применения в раскрытых в настоящем документе композициях и способах. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное IgG1-антитело, которое блокирует связывание CTLA-4 с его B7-лигандами, за счет чего обеспечивается стимуляция активации Т-клеток и повышение общей выживаемости (OS) у пациентов с распространенной меланомой.

[0417] Согласно конкретным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой тремелидумаб.

[0418] Согласно конкретным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой МК-1308.

[0419] Согласно конкретным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой AGEN-1884.

[0420] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 является нефукозилированным или гипофукозилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 характеризуется усиленными ADCC и/или ADCP активностью. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой BMS-986218, описанное в PCT/US18/19868.

[0421] Используемые в раскрытых композициях и способах антитела к CTLA-4 также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 человека и перекрестно конкурируют за связывание с CTLA-4 человека с любым раскрытым в настоящем документе антителом к CTLA-4, например, ипилимумабом и/или тремелидумабом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 связывает тот же эпитоп, что и любое из описанных в настоящем документе антител к CTLA-4, например, ипилимумаб и/или тремелидумаб. Способность антител к перекрестному конкурентному связыванию за связывание с антигеном указывает на то, что такие антитела связываются с той же соответствующей эпитопу областью антигена и способствуют пространственному затруднению связывания других перекрестно конкурирующих антител с такой конкретной соответствующей эпитопу областью. Ожидается, что такие перекрестно конкурирующие антитела обладают функциональными свойствами, очень похожими с таковыми эталонного антитела, например, ипилимумаба и/или тремелидумаба, благодаря их связыванию с той же соответствующей эпитопу

областью CTLA-4. Перекрестно конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основе их способности к перекрестному конкурированию с ипилимумабом и/или тремелиумабом в стандартных анализах связывания CTLA-4, таких как анализ с применением системы Bioss, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

[0422] Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют с ипилимумабом и/или тремелиумабом за связывание с CTLA-4 человека, или связываются с той же соответствующей эпитопу областью CTLA-4 человека, что и ипилимумаб и/или тремелиумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям такие перекрестно конкурирующие антитела являются химерными антителами, сконструированными антителами или гуманизированными антителами или антителами человека. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или моноклональные антитела человека можно получать и выделять с помощью хорошо известных в данной области способов.

[0423] Используемые в композициях и способах по настоящему изобретению антитела к CTLA-4 также включают антигенсвязывающие части описанных выше антител. Было подробно продемонстрировано, что функция антитела, заключающаяся в связывании антигена, может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

[0424] Антитела к CTLA-4, подходящие для применения в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с CTLA-4 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют активность CTLA-4 и нарушают взаимодействие CTLA-4 с рецептором B7 человека. В любых из раскрытых в настоящем документе композиций или способов «антитело» к CTLA-4 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, которые связываются с CTLA-4 и проявляют функциональные свойства, подобные таковым полных антител, в отношении ингибирования взаимодействия CTLA-4 с рецептором B7 человека и активации иммунной системы. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ипилимумабом и/или тремелиумабом за связывание с CTLA-4 человека.

XI.D. Антитела к LAG-3

[0425] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к LAG-3. Антитела к LAG-3 по настоящему раскрытию связываются с LAG-3 человека. Антитела, которые связываются с LAG-3, были раскрыты в международной публикации № WO/2015/042246 и публикациях США №№ 2014/0093511 и 2011/0150892.

[0426] Иллюстративное антитело к LAG-3, пригодное в настоящем раскрытии, представляет собой 25F7 (описано в публикации США № 2011/0150892). Дополнительное иллюстративное антитело к LAG-3, пригодное в настоящем раскрытии, представляет собой BMS-986016. Согласно одному варианту осуществления пригодное для композиции антитело к LAG-3 перекрестно конкурирует с 25F7 или BMS-986016. Согласно другому варианту осуществления пригодное для композиции антитело к LAG-3 связывается с тем же эпитопом, что и 25F7 или BMS-986016. Согласно другим вариантам осуществления антитело к LAG-3 содержит шесть CDR 25F7 или BMS-986016.

XI.E. Антитела к CD137

[0427] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к CD137. Антитела к CD137 специфически связываются с CD137-экспрессирующими иммунными клетками и активируют их, стимулируя иммунный ответ, в частности, опосредованный цитотоксическими Т-клетками ответ, в отношении опухолевых клеток. Антитела, которые связываются с CD137, были раскрыты в публикации США № 2005/0095244 и заявках на выдачу патента США №№ 7288638, 6887673, 7214493, 6303121, 6569997, 6905685, 6355476, 6362325, 6974863 и 6210669.

[0428] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой урелумаб (BMS-663513), описанное в заявке на выдачу патента США № 7288638 (20H4.9-IgG4 [10C7 или BMS-663513]). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой BMS-663031 (20H4.9-IgG1), описанное в заявке на выдачу патента США № 7288638. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой 4E9 или BMS-554271, описанное в заявке на выдачу патента США № 6887673. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой антитело, раскрытое в заявках на выдачу патента США №№ 7214493; 6303121; 6569997; 6905685; или 6355476. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой 1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3E1, описанные в заявке на выдачу патента США № 6362325. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой антитело, раскрытое в выданном патенте США № 6974863 (такое как 53A2). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137 представляет собой антитело, раскрытое в выданном патенте США № 6210669 (такое как 1D8, 3B8 или 3E1). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой PF-05082566 Pfizer (PF-2566). Согласно другим вариантам осуществления пригодное для настоящего изобретения антитело к CD137 перекрестно конкурирует с раскрытыми в настоящем документе антителами к CD137. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD137

связывается с тем же эпитопом, что и раскрытое в настоящем документе антитело к CD137. Согласно другим вариантам осуществления пригодное в настоящем раскрытии антитело к CD137 содержит шесть CDR раскрытых в настоящем документе антител к CD137.

XI.F. Антитела к KIR

[0429] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к KIR3. Антитела, которые специфически связываются с KIR, блокируют взаимодействие иммуноглобулин-подобных рецепторов клеток-киллеров (KIR) на поверхности NK-клеток с их лигандами. Блокирование этих рецепторов способствует активации NK-клеток и, возможно, разрушению последними опухолевых клеток. Примеры антител к KIR были раскрыты в международных публикациях №№ WO/2014/055648, WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 и WO/2012/160448.

[0430] Одним из пригодных в настоящем раскрытии антител к KIR является лирилумаб (также называемый BMS-986015, IPH2102 или S241P-вариант 1-7F9), впервые описанный в международной публикации № WO 2008/084106. Дополнительным пригодным в настоящем раскрытии антителом к KIR является 1-7F9 (также называемое IPH2101), описанное в международной публикации № WO 2006/003179. Согласно одному варианту осуществления антитело к KIR для композиции по настоящему изобретению перекрестно конкурирует за связывание с KIR с лирилумабом или I-7F9. Согласно другому варианту осуществления антитело к KIR связывается с тем же эпитопом, что и лирилумаб или I-7F9. Согласно другим вариантам осуществления антитело к KIR содержит шесть CDR лирилумаба или I-7F9.

XI.G. Антитела к GITR

[0431] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к GITR. Антитела к GITR могут представлять собой любое антитело к GITR, которое специфически связывается с GITR человека в качестве мишени и активирует глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR). GITR является представителем суперсемейства рецепторов TNF, который экспрессируется на поверхности нескольких типов иммунных клеток, включая регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и активированные дендритные клетки («агонистические антитела к GITR»). В частности, активация GITR обеспечивает повышение в отношении пролиферации и функции эффекторных Т-клеток, а также устранение супрессии, индуцированной активированными регуляторными Т-клетками. Кроме того, стимуляция GITR запускает противоопухолевый иммунитет за счет повышения активности других иммунных клеток, таких как NK-клетки,

антигенпредставляющие клетки и В-клетки. Примеры антител к GITR были раскрыты в международных публикациях №№ WO/2015/031667, WO2015/184099, WO2015/026684, WO11/028683 и WO/2006/105021, заявках на выдачу патента США №№ 7812135 и 8388967 и публикациях США №№ 2009/0136494, 2014/0220002, 2013/0183321 и 2014/0348841.

[0432] Согласно одному варианту осуществления пригодное в настоящем раскрытии антитело к GITR представляет собой TRX518 (описанное, например, в Schaer *et al. Curr Opin Immunol.* (2012) Apr; 24(2): 217–224 и WO/2006/105021). Согласно другому варианту осуществления антитело к GITR выбрано из MK4166, MK1248 и антител, описанных в WO11/028683 и U.S. 8709424, и содержащих, например, VH-цепь, содержащую SEQ ID NO: 104, и VL-цепь, содержащую SEQ ID NO: 105 (причем указанные SEQ ID NO взяты из WO11/028683 или U.S. 8709424). Согласно определенным вариантам осуществления антитело к GITR представляет собой антитело к GITR, которое раскрыто в WO2015/031667, например, антитело, содержащее CDR 1-3 VH, содержащие SEQ ID NO: 31, 71 и 63 из WO2015/031667 соответственно, и CDR 1-3 VL, содержащие SEQ ID NO: 5, 14 и 30 из WO2015/031667. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к GITR представляет собой антитело к GITR, которое раскрыто в WO2015/184099, например, антитело Hum231#1 или Hum231#2, или их CDR или их производное (например, pab1967, pab1975 или pab1979). Согласно определенным вариантам осуществления антитело к GITR представляет собой антитело к GITR, которое раскрыто в JP2008278814, WO09/009116, WO2013/039954, US20140072566, US20140072565, US20140065152 или WO2015/026684, или представляет собой INBRX-110 (INHIBRx), LKZ-145 (Novartis) или MEDI-1873 (MedImmune). Согласно определенным вариантам осуществления антитело к GITR представляет собой антитело к GITR, которое описано в PCT/US2015/033991 (например, антитело, содержащее вариabельные области 28F3, 18E10 или 19D3). Например, антитело к GITR может представлять собой антитело, содержащее следующие VH- и VL-цепи или их CDR:

[0433] VH:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDV
WGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 78) и

[0434] VL:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:
79); или

[0435] VH:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFWVRQAPGKGLEWVAVIWY
AGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDY YYYVVM
DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 80) и

[0436] VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
81); или

[0437] VH:

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
AGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYSM
DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 82) и

[0438] VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
83).

[0439] Согласно определенным вариантам осуществления антитело, содержащее пару вышеупомянутых VH- и VL-легких цепей или их CDR, содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1, либо дикого типа, либо подвергнутого мутации, например, с целью сделать его лишенным эффекторной функции. Согласно одному варианту осуществления антитело к GITR содержит следующие аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей:

[0440] тяжелая цепь:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ERKCC
VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 84) и

[0441] легкая цепь:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85) или

[0442] тяжелая цепь:

qvqlvesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwvrqapgkglewvaviwyegsnkyyadsvkgrftisrdnsntly
lqmnsraedtavyycarggsmvrgdyyygmdvwgqgtvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyfpepvtvsw
sgaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtccppapeaegapsvflfppkpkd
tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpssiekti
skakgqprepqvylppsreemtknqvsltcvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvf
scsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO: 86) и

[0443] легкая цепь:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 87).

[0444] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к G1TR перекрестно конкурирует с описанным в настоящем документе антителом к G1TR, например, TRX518, MK4166 или антителом, содержащим описанную в настоящем документе аминокислотную последовательность VH-домена и VL-домена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к G1TR связывает тот же эпитоп, что и описанное в настоящем документе антитело к G1TR, например, TRX518, MK4166 или антитело, содержащее описанную в настоящем документе аминокислотную последовательность VH-домена и VL-домена. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к G1TR содержит шесть CDR TRX518, MK4166 или CDR антитела, содержащего описанную в настоящем документе аминокислотную последовательность VH-домена и VL-домена.

XI.H. Антитела к TIM3

[0445] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к TIM3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIM3 может быть выбрано из антител к TIM3, раскрытых в международных публикациях №№ WO2018013818, WO/2015/117002 (например, MGB453, Novartis), WO/2016/161270 (например, TSR-022, Tesaro/AnaptysBio), WO2011155607, WO2016/144803 (например, STI-600, Sorrento Therapeutics), WO2016/071448, WO17055399; WO17055404, WO17178493, WO18036561, WO18039020 (например, Ly-3221367, Eli Lilly), WO2017205721, WO17079112; WO17079115; WO17079116, WO11159877, WO13006490, WO2016068802, WO2016068803, WO2016/111947, WO/2017/031242.

XI.I. Антитела к OX40

[0446] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к OX40 (также известному как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 может представлять собой BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb Company), описанное в международной публикации № WO20160196228. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 может быть выбрано из антител к OX40, описанных в международных публикациях №№ WO95012673, WO199942585, WO14148895, WO15153513, WO15153514, WO13038191, WO16057667, WO03106498, WO12027328, WO13028231, WO16200836, WO 17063162, WO17134292, WO 17096179, WO 17096281 и WO 17096182.

XI.J. Антитела к NKG2A

[0447] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к NKG2A. NKG2A является представителем семейства рецепторов лектинов С-типа, который экспрессируется на поверхности естественных клеток-киллеров (NK) и субпопуляции Т-лимфоцитов. В частности, NKG2A в первую очередь экспрессируется на поверхности инфильтрирующих опухоль эффекторных NK-клеток врожденного иммунитета, а также на поверхности некоторых типов CD8⁺ Т-клеток. Его естественный лиганд, антиген лейкоцитов человека Е (HLA-E), экспрессируется на солидных опухолях и опухолях кроветворной ткани. NKG2A является ингибирующим рецептором, который блокирует HLA-E.

[0448] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к NKG2A может представлять собой BMS-986315, моноклональное антитело человека, которое блокирует взаимодействие NKG2A с его лигандом HLA-E, обеспечивая таким образом возможность активации противоопухолевого иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к NKG2A может являться ингибитором контрольной точки, который активирует Т-клетки, NK-клетки и/или инфильтрирующие опухоль иммунные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к NKG2A может быть выбрано из антител к NKG2A, описанных, например, в WO 2006/070286 (Innate Pharma S.A.; Университет Генуи); заявке на выдачу патента США № 8993319 (Innate Pharma S.A.; Университет Генуи); WO 2007/042573 (Innate Pharma S/A; Novo Nordisk A/S; Университет Генуи); заявке на выдачу патента США № 9447185 (Innate Pharma S/A; Novo Nordisk A/S; Университет Генуи); WO 2008/009545 (Novo Nordisk A/S); заявках на выдачу патента США №№ 8206709; 8901283; 9683041 (Novo Nordisk A/S); WO 2009/092805 (Novo Nordisk A/S); заявках на выдачу патента США №№ 8796427 и 9422368 (Novo Nordisk A/S);

WO 2016/134371 (Ohio State Innovation Foundation); WO 2016/032334 (Janssen); WO 2016/041947 (Innate); WO 2016/041945 (Academisch Ziekenhuis Leiden H.O.D.N. LUMC); WO 2016/041947 (Innate Pharma); и WO 2016/041945 (Innate Pharma).

XI.K. Антитела к ICOS

[0449] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к ICOS. ICOS представляет собой белок, являющийся контрольной точкой иммунного ответа, который является представителем суперсемейства CD28. ICOS представляет собой трансмембранный белок I типа весом 55-60 кДа, который экспрессируется на поверхности Т-клеток после активации Т-клеток и обеспечивает костимуляцию активации Т-клеток после связывания его лиганда, ICOS-L (B7H2). ICOS также известен как индуцируемый костимулятор Т-клеток, CVID1, AILIM, индуцируемый костимулятор, CD278, индуцируемая активацией лимфоцитарная иммуномедиаторная молекула и антиген CD278.

[0450] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к ICOS может представлять собой BMS-986226, гуманизированное моноклональное IgG-антитело, которое связывается с ICOS человека и стимулирует его. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к ICOS может быть выбрано из антител к ICOS, описанных, например, в WO 2016/154177 (Jounce Therapeutics, Inc.), WO 2008/137915 (MedImmune), WO 2012/131004 (INSERM, Национальный институт здоровья и медицинских исследований Франции), EP3147297 (INSERM, Национальный институт здоровья и медицинских исследований Франции), WO 2011/041613 (Мемориальный онкологический центр им. Слоуна-Кеттеринга), EP 2482849 (Мемориальный онкологический центр им. Слоуна-Кеттеринга), WO 1999/15553 (Институт Роберта Коха), заявках на выдачу патента США №№ 7259247 и 7722872 (Институт Роберта Коха); WO 1998/038216 (Japan Tobacco Inc.), заявках на выдачу патента США №№ 7045615; 7112655 и 8389690 (Japan Tobacco Inc.), заявках на выдачу патента США №№ 9738718 и 9771424 (GlaxoSmithKline) и WO 2017/220988 (Kymab Limited).

XI.L. Антитела к TIGIT

[0451] Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело может представлять собой антитело к TIGIT. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT может представлять собой BMS-986207. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT может представлять собой клон 22G2, описанный в WO 2016/106302. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT может представлять собой MTIG7192A/RG6058/RO7092284 или клон 4.1D3, описанные в WO 2017/053748. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT может

быть выбрано из антител к TIGIT, описанных, например, в WO 2016/106302 (Bristol-Myers Squibb Company) и WO 2017/053748 (Genentech).

XI.M. Дополнительные противораковые средства

[0452] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к IL-10. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с длительно действующей молекулой на основе IL-10. Согласно некоторым вариантам осуществления длительно действующая молекула на основе IL-10 может представлять собой слитую молекулу IL-10-Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления длительно действующая молекула на основе IL-10 может представлять собой пегилированный IL-10, такой как AM0010 (ARMO BioSciences).

[0453] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к IL-2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с длительно действующей молекулой на основе IL-2. Согласно некоторым вариантам осуществления длительно действующий IL-2 может представлять собой пегилированный IL-2, такой как NKTR-214 (Nektar; см. US 8252275, WO12/065086 и WO15/125159).

[0454] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к VISTA.

[0455] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к CD96.

[0456] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к IL-8, например, с HuMax®-IL8.

[0457] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к TGFβ.

[0458] Согласно некоторым другим вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к B7-H4. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к B7-H4 представляет собой антитело к B7-H4, раскрытое в международной публикации № WO/2009/073533.

[0459] Согласно определенным вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к лиганду Fas. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к лиганду Fas представляет собой антитело к лиганду Fas, раскрытое в международной публикации № WO/2009/073533.

[0460] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к CXCR4. Согласно определенным вариантам

осуществления антитело к CXCR4 представляет собой антитело к CXCR4, раскрытое в публикации США № 2014/0322208 (например, улокуплумаб (BMS-936564)).

[0461] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к мезотелину. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к мезотелину представляет собой антитело к мезотелину, раскрытое в заявке на выдачу патента США № 8399623.

[0462] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к HER2. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к HER2 представляет собой Herceptin (заявка на выдачу патента США № 5821337), трастузумаб или адо-трастузумаб эмтанзин (Kadcyla, например, WO/2001/000244).

[0463] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к CD27. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CD-27 представляет собой варилумаб (также известное как «CDX-1127» и «1F5»), представляющее собой IgG1-антитело человека, которое является агонистом CD27 человека, раскрытое, например, в заявке на выдачу патента США № 9169325.

[0464] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B можно применять в комбинации с антителом к CD73. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к CD73 представляет собой CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f.

[0465] Согласно определенным вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает введение химиотерапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическое средство индуцирует экспрессию MICA/B на поверхности опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическое средство выбрано из ингибитора протеасом, иммуномодулирующего лекарственного средства (IMiD), ингибитора Vet и любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, иксазомиба, карфилзомиба, опрозомеиба и маризомиба. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб.

[0466] Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии включает лучевую терапию. В качестве второго средства терапии можно применять любую известную в данной области лучевую терапию.

[0467] Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает введение средства, которое активирует клетки врожденного иммунитета.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, представляет собой агонист NLRP3. Согласно некоторым вариантам осуществления агонист NLRP3 представляет собой моногидрат однозамещенного урата натрия (MSU) и/или адъювант вакцины на основе алюминия. Согласно некоторым вариантам осуществления средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, представляет собой агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7). Согласно некоторым вариантам осуществления агонист TLR7 представляет собой имиквимод (R837), GS-9620 (см. Tsai et al., J. Virology doi:10.1128/JVI.02166-16 (Feb. 8, 2017)), ORN R-2336 (Milttenyl Biotec) или любую их комбинацию.

[0468] Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает введение средства, которое повышает выживаемость естественных клеток-киллеров (NK), CD8⁺ Т-клеток или как одних, так и других. Согласно некоторым вариантам осуществления средство представляет собой IL-2. Согласно определенным вариантам осуществления средство представляет собой пегилированный IL-2.

[0469] Согласно определенным вариантам осуществления второе средство терапии предусматривает введение средства, выбранного из группы, состоящей из доксорубина (ADRIAMYCIN®), цисплатина, карбоплатина, блеомицина сульфата, кармустина, хлорамбуцила (LEUKERAN®), циклофосфида (CYTOXAN®; NEOSAR®), леналидомида (REVLIMID®), бортезомиба (VELCADE®), дексаметазона, митоксантрона, этопозида, цитарабина, бендамустина (TREANDA®), ритуксимаба (RITUXAN®), ифосфамида, винкристина (ONCOVIN®), флударабина (FLUDARA®), талидомида (THALOMID®), алемтузумаба (CAMPATH®), офатумумаба (ARZERRA®), эверолимуса (AFINITOR®, ZORTRESS®), карфилзомиба (KYPROLISTM) и любой их комбинации.

XI.N. Рак

[0470] Антитела к MICA/B могут обеспечивать усиление иммунного ответа в отношении раковых клеток у пациента с раком. В настоящем документе представлены способы лечения субъекта с раком, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к MICA/B, за счет чего обеспечивается лечение субъекта, например, за счет чего обеспечивается ингибирование или снижение темпов роста раковых опухолей и/или достигается регресс опухолей и/или продленная выживаемость. Антитело к MICA/B можно применять отдельно для ингибирования роста раковых опухолей. В качестве альтернативы, антитело к MICA/B можно применять в сочетании с другим средством, например, другим иммуногенным средством, стандартным лечением рака или другим антителом, как описано ниже.

[0471] Следовательно, в настоящем документе представлены способы лечения рака, например, путем ингибирования у субъекта роста опухолевых клеток, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к МСА/В, например, МСА.36, МСА.52, МСА.54, МСА.2 и 71С2 с константной областью IgG дикого типа или вариантом константной области с измененной эффекторной функцией, или его антигенсвязывающей части. Антитело может представлять собой антитело человека к МСА/В (как, например, любое из антител человека к МСА/В человека, описанных в настоящем документе). Формы рака, рост которых можно ингибировать с применением антител по настоящему раскрытию, включают формы рака, как правило, отвечающие на иммунотерапию, и таковые, которые, как правило, не отвечают на иммунотерапию. Формы рака, которые можно лечить, также включают МСА/В-положительные формы рака. Формы рака могут представлять собой формы рака, при которых наблюдают солидные опухоли или злокачественные новообразования кроветворной ткани (гемобластозы). Неограничивающие примеры подлежащих лечению форм рака включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак яичника, рак печени, рак толстой и прямой кишки, рак эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, почечно-клеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонально-рефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак (или карциному) головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, герминогенную опухоль, детскую саркому, лимфому синоназального типа из естественных клеток-киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как злокачественная кожная или интраокулярная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, тестикулярный рак, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак полового члена, рак прямой кишки, солидные опухоли у детей, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (CNS), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль позвоночника, злокачественную опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак,

плоскоклеточный рак, формы рака, индуцированные факторами окружающей среды, включая таковые, индуцированные асбестом, связанные с вирусами формы рака или формы рака, возникающие вследствие инфицирования вирусами (например, вирусом папилломы человека (опухоли, связанные с HPV или возникающие вследствие инфицирования указанным)); и любые комбинации указанных форм рака.

[0472] Неограничивающие примеры подлежащих лечению форм рака включают злокачественные заболевания системы крови, происходящие из одного из двух основных рядов клеток крови, т. е. клеток миелоидного ряда (из клеток которого образуются гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или клеток лимфоидного ряда (из клеток которого образуются В-, Т-, NK- и плазматические клетки), такие как все типы лейкоза, лимфомы и миеломы, например, формы острого, хронического, лимфоцитарного и/или миелоидного лейкоза, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), недифференцированный AML (MO), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (вариант M3 или M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (вариант M4 или M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлоромы; формы лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточное злокачественное заболевание системы крови, например, В-клеточные формы лимфомы, Т-клеточные формы лимфомы, лимфоплазмочитарная лимфома, моноцитотидная В-клеточная лимфома, лимфома из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточные лимфома/лейкоз у взрослых, лимфома из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, Т-лимфобластная; и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), опухоли кроветворной ткани из клеток лимфоидного ряда, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, В-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая

фунгоидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмоцитарная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; формы миеломы, такие как IgG-миелома, миелома Бенс-Джонса, несекретирующая миелома, тлеющая миелома (также называемая вялотекущей миеломой), изолированная плазмочитома и формы множественной миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; опухоли кроветворной ткани из клеток миелоидного ряда, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, формы шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, опухоли кроветворной ткани из клеток лимфоидного ряда, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая без ограничения Т-клеточные нарушения, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-PLL), включая мелкоклеточный тип и тип с клетками с мозговидными ядрами; лейкоз из больших зернистых лимфоцитов (LGL) Т-клеточного типа; а/д Т-NHL-лимфома печени и селезенки; периферическую Т-клеточную лимфому/лимфому из зрелых Т-клеток (плеоморфного и иммунобластного подтипов); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; и любые комбинации указанных форм рака.

[0473] Описанные в настоящем документе способы также можно применять для лечения метастатических форм рака, неоперабельных, рефрактерных форм рака (например, форм рака, рефрактерных к предшествующей иммунотерапии, например, с помощью блокирующего антитела к CTLA-4 или к PD-1) и/или рецидивных форм рака.

[0474] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта наблюдается рак, выбранный из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), меланомы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, злокачественной опухоли желудка, рака толстой кишки, почечно-клеточной карциномы (RCC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), мезотелиомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака предстательной железы, множественной миеломы и комбинаций указанных форм рака.

[0475] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта наблюдается рак, выбранный из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), меланомы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, злокачественной опухоли желудка, рака толстой кишки и комбинаций указанных форм рака.

[0476] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В вводят пациентам с раком, который характеризовался неудовлетворительным ответом на предшествующее лечение, например, предшествующее лечение иммуноонкологическим или иммунотерапевтическим лекарственным средством, или который прогрессировал при прохождении указанного лечения, или пациентам с раком, который является рефрактерным или резистентным, либо по своей природе является рефрактерным или резистентным (например, рефрактерным к антагонисту сигнального пути с участием PD-1), либо таковым, при котором резистентность или рефрактерность является приобретенной. Например, субъектов, у которых не наблюдали ответ или достаточный ответ на первую терапию, или у которых наблюдали прогрессирование после лечения, например, лечения антителом к PD-1, можно лечить путем введения антитела к МІСА/В, отдельно или в комбинации с другой терапией (например, терапией антителом к PD-1).

[0477] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В вводят пациентам, которые ранее не получали (т. е. не подвергались лечению) иммуноонкологическим средством, например, антагонистом сигнального пути с участием PD-1.

[0478] Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения рака у субъекта предусматривает сначала определение того, наблюдается ли у субъекта МІСА/В-положительный статус, например, имеются ли опухолевые клетки, которые экспрессируют МІСА/В, и если у субъекта наблюдается МІСА/В-положительный рак, то указанный способ предусматривает введение субъекту антитела к МІСА/В, например, описанного в настоящем документе. Способ лечения субъекта с раком с использованием антитела к МІСА/В может предусматривать введение субъекту, у которого имеются раковые клетки, которые экспрессируют МІСА/В, терапевтически эффективного количества антитела к МІСА/В. Также в настоящем документе представлены способы предсказания того, будет ли у субъекта наблюдаться ответ на лечение антителом к МІСА/В, причем способы предусматривают определение уровня МІСА/В в раковых клетках пациента, и если раковые клетки субъекта являются МІСА/В-положительными, то у субъекта, вероятно, будет наблюдаться ответ на лечение антителом к МІСА/В.

[0479] Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения рака у субъекта предусматривает сначала определение того, наблюдается ли у субъекта PD-L1- или PD-1-положительный статус, например, имеются ли опухолевые клетки или ТІЛ, которые экспрессируют PD-L1 или PD-1, и если у субъекта наблюдаются PD-L1- или PD-1-положительные рак или ТІЛ-клетки, то указанный способ предусматривает введение субъекту антитела к МІСА/В (и необязательно антагониста PD-1 или PD-L1), например,

описанного в настоящем документе. Способ лечения субъекта с раком с использованием антитела к МІСА/В (и необязательно антагониста PD-1 или PD-L1) может предусматривать введение субъекту, у которого имеются раковые клетки или ТІЛ-клетки, которые экспрессируют PD-L1 или PD-1, терапевтически эффективного количества антитела к МІСА/В (и необязательно антагониста PD-1 или PD-L1). Также в настоящем документе представлены способы предсказания того, будет ли у субъекта наблюдаться ответ на лечение антителом к МІСА/В (и необязательно антагонистом PD-1 или PD-L1), причем способы предусматривают определение уровня PD-L1 или PD-1 в раковых или ТІЛ-клетках пациента, и если раковые или ТІЛ-клетки субъекта являются PD-L1- или PD-1-положительными, то у субъекта, вероятно, будет наблюдаться ответ на лечение антителом к МІСА (и необязательно антагонистом PD-1 или PD-L1).

[0480] Антитело к МІСА/В можно вводить со стандартом лечения. Антитело к МІСА/В можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, терапии, которая предназначена для предупреждения возникновения или рецидива опухолей.

[0481] Антитело к МІСА/В можно применять с другим видом лечения, например, облучением, хирургическим вмешательством или химиотерапией. Например, вспомогательную терапию с использованием антитела к МІСА/В можно применять, если имеется риск, связанный с возможностью наличия микрометастазов, и/или с целью снижения риска повторного проявления.

[0482] Антитело к МІСА/В можно вводить в качестве монотерапии или в качестве единственной иммуностимулирующей терапии. Антитела к МІСА/В, например, описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В, также можно комбинировать с иммуногенным средством, например, раковыми клетками, очищенными опухолевыми антигенами (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетками, а также клетками, трансфицированными генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.*, (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждается ниже).

[0483] Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, например, при формах меланомы. Благодаря снижению порога активации Т-клеток за счет снижения уровня растворимого МІСА/В в плазме крови у реципиента может происходить активация ответов опухоли, что обеспечивает возможность лечения неиммуногенных опухолей или таковых с ограниченной иммуногенностью.

[0484] Антитело к MICA/B, например, описанное в настоящем документе антитело к MICA/B, можно комбинировать со схемой вакцинации. Было разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 в DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, пятое издание). Согласно одной из таких стратегий вакцину получают с применением аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что такие вакцины на основе клеток являются наиболее эффективными, если опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является сильным активатором представления антигена при противоопухолевой вакцинации (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

[0485] Исследование экспрессии генов и крупномасштабных наборов экспрессирующихся генов в ряде опухолей привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях такие опухолеспецифические антигены являются дифференцировочными антигенами, экспрессируемыми в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, многие из этих антигенов могут оказываться мишенями опухолеспецифических Т-клеток, присутствующих в организме-хозяине. Лечение антителом к MICA/B можно применять в сочетании с коллекцией рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, с целью выработки иммунного ответа на такие белки. Такие белки обычно распознаются иммунной системой как собственные антигены, и, следовательно, она является толерантной к ним. Опухолевый антиген может включать белок теломеразу, которая необходима для синтеза теломеров хромосом, и которая экспрессируется при более чем 85% формах рака человека, и только в ограниченном числе соматических тканей (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). Опухолевый антиген также может представлять собой «неоантигены», экспрессируемые в раковых клетках вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки из двух неродственных последовательностей (т. е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме), или идиотип из В-клеточных опухолей.

[0486] Другие противоопухолевые вакцины могут включать белки вирусов, причастных к развитию злокачественных опухолей человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и герпесвирус, ассоциированный с

саркомой Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифического антигена, который можно применять в сочетании с введением антитела к МІСА/В, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные собственно из опухолевой ткани. Такие белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и такие HSP являются высокоэффективными в отношении доставки к антигенпредставляющим клеткам для стимуляции противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278: 117-120).

[0487] Дендритные клетки (DC) являются эффективными антигенпредставляющими клетками, которые можно применять для запуска антигенспецифических ответов. DC можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также можно трансдуцировать генетическим материалом для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также сливали непосредственно с опухолевыми клетками для иммунизации (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации, иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с введением антитела к МІСА/В с целью активации более сильных противоопухолевых ответов.

[0488] Введение антитела к МІСА/В также можно комбинировать со стандартными видами лечения рака (например, хирургическим вмешательством, облучением и химиотерапией). Введение антитела к МІСА/В можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях допускается снижение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является антитело к МІСА/В в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является антитело к МІСА/В в комбинации с интерлейкином-2 (ІL-2), например, пегилированным ІL-2, для лечения меланомы. Научным обоснованием в поддержку комбинированного применения антитела к МІСА/В и химиотерапии является то, что гибель клеток, обусловленная цитотоксическим действием большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышению уровней опухолевого антигена в рамках пути представления антигена. Другими видами комбинированной терапии, которые могут обеспечить синергическое действие с введением антитела к МІСА/В посредством гибели клеток, являются облучение, хирургическое вмешательство и антигормональная терапия. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в организме-хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с введением антитела к МІСА/В. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели клеток, что может обеспечить включение опухолевого антигена в пути представления антигена в организме-хозяине.

[0489] Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B также можно применять в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие Fc α - или Fc γ -рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела к Fc-рецептору/опухолевому антигену (например, Her-2/neu) применяли для нацеливания макрофагов в места локализации опухоли. Такое нацеливание может обеспечить более эффективную активацию опухолеспецифических ответов. Т-клеточная ветвь этих ответов будет усиливаться действием антитела к MICA/B. В качестве альтернативы, антиген может быть доставлен непосредственно к DC путем применения биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим маркером клеточной поверхности дендритной клетки.

[0490] Опухоли уклоняются от иммунного надзора организма-хозяина с помощью целого ряда механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессорными. Они включают, среди прочего, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и лиганд Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно применять в комбинации с антителами к MICA/B для противодействия эффектам иммуносупрессорного агента и для содействия противоопухолевым иммунным ответам организма-хозяина.

[0491] Другие антитела, которые активируют ответную реакцию иммунитета организма-хозяина, можно применять в комбинации с антителами к MICA/B. Они включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и представление антигена. Антитела к CD40 способны эффективно заменять активность хелперных Т-клеток (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478), и их можно применять в сочетании с антителами к MICA/B. Активирующие антитела к Т-клеточным костимулирующим молекулам, таким как CTLA-4 (например, заявка на выдачу патента США № 5811097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. Ингибиторы PD1 или PD-L1 также можно применять в сочетании с антителом к MICA/B. Другие комбинации представлены в другом месте настоящего документа.

[0492] Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей, происходящих из кроветворной ткани. Принимая во внимание тот

факт, что следствием такого лечения является реакция «трансплантат против хозяина», может быть получена терапевтическая польза от реакций «трансплантат против опухоли». Ингибирование МІСА/В можно применять для повышения эффективности привитых донорских опухолеспецифических Т-клеток.

[0493] Также существует несколько протоколов экспериментального лечения, которые включают *ex vivo* активацию и размножение антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью стимуляции антигенспецифических Т-клеток в отношении опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Такие способы также можно применять для активации Т-клеточных ответов по отношению к инфекционным агентам, таким как CMV. *Ex vivo* активация в присутствии антител к МІСА/В может повысить число и активность Т-клеток, подвергаемых адоптивному переносу.

XI.O. Инфекционные заболевания

[0494] Описанные в настоящем документе способы также можно применять для лечения пациентов, которые были подвержены воздействию определенных токсинов или патогенов. Следовательно, другой описанный в настоящем документе аспект относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающему введение субъекту антитела к МІСА/В, за счет чего обеспечивается лечение у субъекта инфекционного заболевания.

[0495] Подобно его применению по отношению к опухолям, как обсуждалось выше, антитела к МІСА/В можно вводить отдельно или в качестве вспомогательного средства в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа против патогенов, токсинов и собственных антигенов. Примеры патогенов, для которых такой терапевтический подход может быть особенно пригодным, включают патогены, для которых в настоящее время не существует эффективной вакцины, или патогенов, для которых обычные вакцины являются менее эффективными. Они включают без ограничения ВИЧ, вирусы гепатита (А, В и С), гриппа, герпеса, лямблии, плазмодии, вызывающие малярию, лейшмании, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Антитела к МІСА/В могут быть пригодны в отношении развившихся инфекций, вызванных такими агентами, как ВИЧ, которые представляют измененные антигены в ходе инфекций. Такие новые эпитопы распознаются как чужеродные при введении антитела к МІСА/В человека, вызывая, вследствие, сильный Т-клеточный ответ.

XI.P Виды комбинированной терапии

[0496] В дополнение к представленным выше комбинированным видам терапии антитела к МІСА/В, например, таковые, описанные в настоящем документе, также можно

применять в качестве комбинированной терапии, например, для лечения рака, как описано ниже.

[0497] В настоящем документе предусмотрены способы комбинированной терапии, в которых антитело к МІСА/В вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например, низкомолекулярными лекарственными средствами, антителами или их антигенсвязывающими частями, которые являются эффективными в стимулировании иммунных ответов, для обеспечения, таким образом, дополнительного усиления, стимуляции или активации иммунных ответов у субъекта.

[0498] Как правило, антитело к МІСА/В, например, описанное в настоящем документе, можно комбинировать с (i) агонистом стимулирующей (например, костимулирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала или молекулы (например, рецептора или лиганда) на поверхности иммунных клеток, таких как Т-клетки, причем в обоих случаях обеспечивается усиление иммунных ответов, таких как антигенспецифические Т-клеточные ответы. Согласно некоторым аспектам иммуноонкологическим средством является (i) агонист стимулирующей (включая костимулирующую) молекулы (например, рецептора или лиганда) или (ii) антагонист ингибирующей (включая коингибирующую) молекулы (например, рецептора или лиганда) на поверхности клеток, например, таковых, ингибирующих активацию Т-клеток, или таковых, вовлеченных во врожденный иммунитет, например, NK-клеток, и при этом иммуноонкологическое средство усиливает врожденный иммунитет. Такие иммуноонкологические средства зачастую называют регуляторами контрольных точек иммунного ответа, например, ингибитором контрольной точки иммунного ответа или стимулятором контрольной точки иммунного ответа.

[0499] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к МІСА/В вводят со средством, которое нацеливается на стимулирующую или ингибирующую молекулу, которая является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, антитела к МІСА/В, например, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту со средством, которое нацеливается на представителя семейства IgSF с целью повышения иммунного ответа. Например, антитело к МІСА/В можно вводить со средством, которое нацеливается (или специфически связывается с ним) на представителя семейства В7 мембраносвязанных лигандов, который включает В7-1, В7-2, В7-Н1 (PD-L1), В7-DC (PD-L2), В7-Н2 (ICOS-L), В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5 (VISTA) и В7-Н6, или костимулирующий или коингибирующий рецептор или лиганд, специфически связывающийся с представителем семейства В7.

[0500] Антитело к MICA/B также можно вводить со средством, которое нацеливается на представителя семейства молекул TNF и TNFR (лигандов или рецепторов), такого как CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTpR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LTpR, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR (см., например, Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00: 1).

[0501] Т-клеточные ответы можно стимулировать путем комбинации антител к MICA/B с переменными областями, например, MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 и 71C2, и одного или нескольких из следующих средств:

[0502] (1) антагонист (ингибитор или блокирующее средство) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, GITR и LAG-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-3 и TIM-4; и/или

[0503] (2) агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

[0504] Иллюстративные средства, которые модулируют один из вышеупомянутых белков, и которые можно комбинировать с антителами к MICA/B, например, таковыми, описанными в настоящем документе, для лечения рака, включают: YERVOY® (ипилимумаб) или тремелиумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), MK-3475 (к PD-1), атезолизумаб (TECENTRIQ®), AMP224 (к B7DC), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3), IMP321 (к LAG-3), BMS-663513 (к CD137), PF-05082566 (к CD137), CDX-1127 (к CD27), антитело к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (к OX40L), атацицепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), лукатумумаб (к CD40), дацетузумаб (к CD40), муромонаб-CD3 (к CD3); антитела к GITR MK4166, TRX518, Medi1873, INBRX-110, LK2-145, GWN-323, GITRL-Fc или любую их комбинацию.

[0505] Другие молекулы, которые можно комбинировать с антителами к MICA/B для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на поверхности НК-клеток или агонисты активирующих рецепторов на поверхности НК-клеток. Например, антитела к MICA/B можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

[0506] Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами, и антитела к MICA/B можно вводить субъекту, например, с раком, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

[0507] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к MICA/B можно применять в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; «иммуносупрессорные цитокины»), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимулирования иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

[0508] Еще одни средства для комбинированных видов терапии включают средства, которые ингибируют или сокращают число макрофагов или моноцитов, включая без ограничения антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела к CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

[0509] Антитела к MICA/B также можно вводить со средствами, которые ингибируют передачу сигнала с участием TGF- β .

[0510] Дополнительные средства, которые можно комбинировать с антителом к MICA/B, включают средства, которые усиливают представление опухолевого антигена, например, вакцины на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF вакцины на основе клеток, олигонуклеотиды CpG и имиквимод, или средства терапии, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

[0511] Еще одни средства терапии, которые можно комбинировать с антителом к MICA/B, включают средства терапии, которые сокращают число или блокируют клетки Treg, например, средство, которое специфически связывается с CD25.

[0512] Другим терапевтическим препаратом, который можно комбинировать с антителом к MICA/B, является терапевтический препарат, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа, или синтаза оксида азота. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) или F001287.

[0513] Другой класс средств, которые можно применять с антителом к МІСА/В, включает средства, которые ингибируют образование аденозина, например, ингибиторы CD73, или ингибируют рецептор аденозина A2a.

[0514] Другие средства терапии, которые можно комбинировать с антителом к МІСА/В для лечения рака, включают средства терапии, которые обращают/предотвращают толерантность или истощение Т-клеток, и терапевтические препараты, которые вызывают активацию врожденной иммунной реакции и/или воспаление в месте локализации опухоли.

[0515] Антитело к МІСА/В можно комбинировать более чем с одним иммуноонкологическим средством, и можно комбинировать, например, с комбинаторным подходом, который позволяет целенаправленно воздействовать на несколько элементов сигнального пути в рамках иммунной реакции, как, например, одним или несколькими из следующего: терапевтический препарат, который усиливает представление опухолевого антигена (например, вакцина на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF вакцины на основе клеток, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); терапевтический препарат, который ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования сигнального пути с участием CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или путем сокращения числа или блокирования Treg или других иммуносупрессорных клеток; терапевтический препарат, который стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, агонисты, которые стимулируют сигнальный путь с участием CD-137, OX-40 и/или CD40 или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапевтический препарат, который системно повышает число противоопухолевых Т-клеток; терапевтический препарат, который сокращает число или ингибирует Treg, например, Treg в опухоли, например, с применением антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем *ex vivo* сокращения числа клеток с использованием гранул, связанных с антителами к CD25; терапевтический препарат, который влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапевтический препарат, который усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, включая генетически модифицированные клетки, например, клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (CAR-T-терапия); терапевтический препарат, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа, или синтаза оксида азота; терапевтический препарат, который обращает/предотвращает толерантность или истощение Т-клеток; терапевтический препарат, который вызывает активацию врожденной иммунной реакции и/или воспаление в месте локализации опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов; или блокирование иммуноподавляющих цитокинов.

[0516] Описанные в настоящем документе антитела к MICA/B можно применять вместе с одним или несколькими из агонистических средств, которые связывают положительные костимулирующие рецепторы, блокирующих средств, которые подавляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, антагонистами, и одним или несколькими средствами, которые системно повышают число противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые подавляют отдельные иммуносупрессорные сигнальные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют вовлечение ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), сокращают число или ингибируют Treg (например, с применением моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем *ex vivo* сокращения числа клеток с использованием гранул, связанных с антителами к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают толерантность или истощение Т-клеток), и средствами, которые вызывают активацию врожденной иммунной реакции и/или воспаление в местах локализации опухоли.

[0517] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B вводят субъекту вместе с ингибитором BRAF, если у субъекта наблюдается положительный по мутации BRAF V600 статус.

[0518] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B вводят субъекту вместе с антителом, которое специфически связывает PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGF β , IL-10, IL-8, IL-2, B7-H4, лиганд Fas, CXCR4, мезотелин, CD27, VISTA, CD96, GITR или любую их комбинацию.

[0519] Антитела к MICA/B и комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, также можно применять в сочетании с другими хорошо известными видами терапии, которые выбирают в соответствии с их конкретной эффективностью в отношении показания, подлежащего лечению (например, рака). Комбинации описанных в настоящем документе антител к MICA/B можно применять последовательно с известным(-и) фармацевтически приемлемым(-и) средством(-ами).

[0520] Например, антитела к MICA/B и комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации (например, параллельно или отдельно) с дополнительным лечением, таким как облучение и/или химиотерапия (например, с применением камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина, паклитаксела (Taxol), доксорубина или камптотецина + аro21/TRAIL (6X комбинация)), один или несколько ингибиторов протеасом (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl),

ингибитор индоламиндиоксигеназы-1 (например, INCB24360, индоксимод, NLG-919 или F001287), AT-101 (производное R-(-)-госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклакс) или MCL-1 (антагонисты дифференцировочного белка 1 клеток миелоидного лейкоза), антагонисты iAP (ингибитора белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярный миметик smac, синтетические пептиды smac (см. Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, нацеленные на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (см. Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточного FLICE-ингибирующего белка) (например, природные и синтетические лиганды PPAR γ (рецептора γ , активируемого пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназ (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналидомид, ингибиторы GSK3 β , ингибиторы IAP и/или генотоксичные лекарственные средства.

[0521] Антитела к MICA/B и комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, можно дополнительно применять в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксичными средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве антипролиферативных цитотоксичных средств, включают без ограничения следующие.

[0522] Алкилирующие средства (включая без ограничения азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN[®]), фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентеофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

[0523] Антиметаболиты (включая без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

[0524] Подходящие антипролиферативные средства для комбинирования с антителами к MICA/B, без ограничения, таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOLTM), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фурано-эпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В,

[18] дегидродезоксипотилоны В, С12,13-циклопропил-эпотилон А, С6-С8-мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-дезметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, АВJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотина гидрохлорид), галихондрин В, эрибулина мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТИ-286), Е-7974, криптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты на основе майтанзиноида (DM-1), MKC-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиb), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим средствам, стабилизирующим микротрубочки, известным в данной области.

[0525] В тех случаях, когда желательным является введение аномально пролиферирующих клеток в состояние покоя, во время или до лечения описанными в настоящем документе антителами к МІСА/В, пациенту также можно вводить гормоны и стероиды (включая синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстилбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестрола ацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестерона ацетат, лейпрорелин, флутамид, торемифен, ZOLADEx®. При использовании описанных в настоящем документе способов или композиций, при необходимости, также можно вводить другие средства, применяемые для модуляции роста опухоли или метастазирования в клинических условиях, например, антимиметики.

[0526] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинацию антитела к МІСА/В и обсуждаемого в настоящем документе второго средства можно вводить одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с антителом к МІСА/В и вторым средством в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинацию антитела к МІСА/В и второго средства можно вводить последовательно. Введение двух средств можно начинать в моменты времени, которые разделены интервалом, например, в 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 5 дней, 7 дней или одну или несколько недель, или введение второго средства можно начинать, например, через 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 5 дней, 7 дней или одну или несколько недель после введения первого средства.

[0527] Согласно некоторым вариантам осуществления антинеопластическое антитело, которое можно комбинировать с антителом к MICA/B и/или вторым средством, включает RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тозитумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпратузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб) или любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления второе антитело, пригодное для комбинированной терапии с антителом к MICA/B, может представлять собой конъюгат антитела и лекарственного средства.

[0528] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B, отдельно или в комбинации с другим средством, применяют одновременно или последовательно с трансплантацией костного мозга для лечения ряда опухолей, происходящих из кроветворной ткани.

[0529] В настоящем документе представлены способы изменения нежелательного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака) иммуностимулирующим средством, предусматривающие введение субъекту антитела к MICA/B со вторым средством или без него. Например, описанные в настоящем документе способы предусматривают способ снижения частоты возникновения индуцируемого иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения пациенту невсасывающегося стероида. В контексте настоящего документа «невсасывающийся стероид» представляет собой глюкокортикоид, который характеризуется интенсивным пресистемным метаболизмом, вследствие чего после метаболического преобразования в печени биодоступность стероида является низкой, т. е. менее чем приблизительно 20%. Согласно некоторым описанным в настоящем документе вариантам осуществления невсасывающийся стероид представляет собой будесонид. Будесонид является глюкокортикостероидом с местным действием, который после перорального приема подвергается интенсивному метаболизму, главным образом в печени. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой пероральный состав будесонида с зависящим от pH и времени высвобождением, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и все отделы толстой кишки. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона от легкой до средней степени тяжести, затрагивающей подвздошную кишку и/или восходящую кишку. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к MICA/B в сочетании с невсасывающимся стероидом дополнительно можно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают средства 5-ASA, такие как, например: сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); и

месаламин (ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay).

Таблица 1. Последовательности.

SEQ ID	Описание	Последовательности
1	VH1 19G6-MICA.36	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC CTGGGAGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGCC ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCGAGGGGCTGGAAT GGGTGGCACTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATTCTA TGGAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA GCGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGG AAGTGGGCACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
2	VH1 19G6-MICA.36	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQA PGEGLWVALIWYDGSNKF YGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAVYYCARE GSGHYWGQGLTVTVSS
3	VK1 19G6-MICA.36	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT CTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATCAGCAGTGCTTTA GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTCCC TGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATT ACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGATTAAA
4	VK1 19G6-MICA.36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKP GKVPKSLIYDASSLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPITFG QGTRLEIK
5	VH1_CDR1 19G6-MICA.36	NYAMH

SEQ ID	Описание	Последовательности
6	VH1_CDR2 19G6-MICA.36	LIWYDGSNKFYGD SVKG
7	VH1_CDR3 19G6-MICA.36	EGSGHY
8	VK1_CDR1 19G6-MICA.36	RASQGISSALA
9	VK1_CDR2 19G6-MICA.36	DASSLES
10	VK1_CDR3 19G6-MICA.36	QQFNSYPIT
11	VH1 16A5-MICA.52	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTT TAAGAGGTGTCCAGTGTCA GGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATAACATA CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCAGTTATAAGGTATGATGGAATTAATAAATACTATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGCGGGCCCCC TGATGCTTTTAATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA
12	VH1 16A5-MICA.52	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGDVVQPG RSLRLS CAASGFTFSNYNIHWVRQA PGKGLEWVAVIRYDGINKYYADSVKGRFII SRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASGP PDAFNIWGQGTMTVTVSS
13	VK1 16A5-MICA.52	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCT GGCTCCCAGGTGCCAGATG TGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTC AGGGCATCAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGTTCCTAAGTCCCTGATCTATGATGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC

SEQ ID	Описание	Последовательности
		TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGT TACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AA
14	VK1 16A5-MICA.52	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQGISSALAWYQQK PGKVPKSLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIK
127	VK2 16A5-MICA.52	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGC TGCTCTGGCTCCCAGGTGC CAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGT GCTTTAGCCTGGTATCAGCA GAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCC TCCAGTTTGGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATCAGCAGCCT GCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTT AATAGTTACCCATTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
128	VK2 16A5-MICA.52	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQFNSYPFTFGPGTKVDIK
15	VH1_CDR1 16A5-MICA.52	NYNIH
16	VH1_CDR2 16A5-MICA.52	VIRYDGINKYYADSVKG
17	VH1_CDR3 16A5-MICA.52	GPPDAFNI
18	VK1_CDR1 16A5-MICA.52	RASQGISSALA
19	VK1_CDR2 16A5-MICA.52	DASSLES

SEQ ID	Описание	Последовательности
20	VK1_CDR3 16A5-MICA.52	QQFNSYPIT
21	VH1 24G11-MICA.54	ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTC TCCAAGGAGTCTGTGCCGA GGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCC GGGGAGTCTCTGAAGATCTC CTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAACTACTGGATC GGCTGGGTGCGCCAGATGCC CGGGAAAGGCCTGGAGTGGTTGGGGATCATCCATCCTGGT GACTCTTATAACCAGATACAG CCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATATAT TACTGTGCGAGAGAGGGTAT AGCAGCAACTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCA
22	VH1 24G11-MICA.54	MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYSFTNYWIGWVRQM PGKGLEWLGIHPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAIYYCAREG IAATPFDYWGQGLVTVSS
23	VK1 24G11-MICA.54	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCT GGCTCCCAGATAACCAACCGG AGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTA GCCTGGTTCCAACAGAAACC TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAC AGGGCCACTGGCATCCCAGC CAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAAC TGGCCTCCGACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEQ ID	Описание	Последовательности
24	VK1 24G11-MICA.54	MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWFQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE PEDFAVYYCQQRSNWPPTFG QGTKVEIK
25	VH1_CDR1 24G11-MICA.54	NYWIG
26	VH1_CDR2 24G11-MICA.54	IIHPGDSYTRYSPSFQG
27	VH1_CDR3 24G11-MICA.54	EGIAATPFDY
28	VK1_CDR1 24G11-MICA.54	RASQSVSSYLA
29	VK1_CDR2 24G11-MICA.54	DASNRAT
30	VK1_CDR3 24G11-MICA.54	QQRSNWPPT
31	VH1 3F5-MICA.2	ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGATTTTCCTTGTTGCTATTT TAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAATCTGG GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACCTATAGCATGA ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT TTCATACATTAGTTATCGTAGTCGTACCATATACTACGCA GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATG CCAGGAAC TACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGA CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGGGGCTAT GGTTCGGGGGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGG TCACCGTCTCCTCA
32	VH1 3F5-MICA.2	MELGLCWIFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISYRSRTIYYA DSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARWGY GSGGFDYWQGTLTVSS
33	VK1 3F5-MICA.2	ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCT GGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTC TCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC

SEQ ID	Описание	Последовательности
		CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCATTCACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGATATCAAA
34	VK1 3F5-MICA.2	METPAQLLFLLLLLWLPD TTGEIVLTQSPG T LSLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSSFTFGP GTKVDIK
35	VH1_CDR1 3F5- MICA.2	TYSMN
36	VH1_CDR2 3F5- MICA.2	YISYRSRTIYYADSVKG
37	VH1_CDR3 3F5- MICA.2	WGYGSGGFDY
38	VK1_CDR1 3F5- MICA.2	RASQSVSSSYLA
39	VK1_CDR2 3F5- MICA.2	GASSRAT
40	VK1_CDR3 3F5- MICA.2	QQYGSSFT
41	VH1 71C2	ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTT TAAAAGGTGTCCAGTGTGA AGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGCAGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAATAATTATGCCATG CACTGGGTCCGGCAAGCTCC AGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAAT AGTGATAGCATAGGCTATGC GGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCCCTGTATCT GCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTAT

SEQ ID	Описание	Последовательности
		TACTGTGCAAAAGATTCCGT ATTACTATGGTTCGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTC A
42	VH1 71C2	MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASGFTFNMYAMHWVRQA PGKGLEWVSGITWNSDSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTALYYCAKDS VLLWFGGMDVWGQGTITVTVSS
43	VK1 71C2	ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCT GGCTCCCAGATAACCACCGG AGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC AGCAGGGCCACTGGCATCCC AGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGT AGCTCACCTCCGTACACTTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
44	VK1 71C2	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLISLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPPYT FGQGTKLEIK
45	VH1_CDR1 71C2	NYAMH
46	VH1_CDR2 71C2	GITWNSDSIGYADSVKG
47	VH1_CDR3 71C2	DSVLLWFGGMDV
48	VK1_CDR1 71C2	RASQSVSSSYLA
49	VK1_CDR2 71C2	GASSRAT
50	VK1_CDR3 71C2	QQYGSSPPYT
58	Аминокислотная последовательность	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQA PGEGLWVALIWYDGSNKFYGDSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGTITVTVSSASTKG

SEQ ID	Описание	Последовательности
	тяжелой цепи 19G6-MICA.36 G236A	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
59	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 19G6-MICA.36 G236A	caggtgcaactggtggagtcctgggggagggcgtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggatt caccttcagtaactatgccatgcactgggtccgccaggct ccaggcgaggggctggaatgggtggcacttatatggtatg atggaagtaataaattctatggagactccgtgaagggccg cttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaatgaacagcctgagcgccgaggacacggctgtgt attactgtgcgagagaggggaagtgggcactactggggcca gggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcaccaagggc ccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacct ctgggggacacagcggccctgggctgcctgggtcaaggacta cttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcc ctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagt cctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcc ctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttg agcccaaattcttgtagacaaaactcacacatgccaccgtg cccagcacctgaactcctggcgaggaccgtcagtccttcctc ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgga cccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt acaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcacccgtcct gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaag gtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacca

SEQ ID	Описание	Последовательности
		tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta caccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcg acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaa caactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagca gggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgca tgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc ctgtccccgggt
60	Аминокислотная последовательность легкой цепи 19G6- MICA.36	aiqltqspsslsasvgrvtitcrasqgissalawyqqkp gkvpksliydasslesgvpsrfsrgsgsgtdftltisslqp edfatyycqqfnsypitfgqgtrleikrtvaapsvfifpp sdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq esvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqg lsspvtksfnrgec
61	Нуклеотидная последовательность легкой цепи 19G6- MICA.36	gccatccagttgacccagtctccatcctccctgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtca gggcatcagcagtgctttagcctgggtatcagcagaaacca gggaaagttcctaagtcctgatctatgatgcctccagtt tggaagtggggtcccatcaagggttcagcggcagtggtatc tgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatagtt acccgatcaccttcggccaaggacacgactggagattaa acgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaca gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctaca gcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggc ctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt gt
62	Аминокислотная последовательность	QVQLVESGGDVVQPGRSRLSCAASGFTFSNYNIHWVRQA PGKGLEWVAVIRYDGINKYYADSVKGRFIIISRDNSKNTLY

SEQ ID	Описание	Последовательности
	тяжелой цепи 16A5-MICA.52	LQMNSLRAEDTAVYYCASGPPDAFNIWGQGTMTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
63	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 16A5-MICA.52	caggtgcagctggtggagtctgggggagacgtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggatt caccttcagtaactataacatacactgggtccgccaggct ccaggcaaggggctggagtgggtggcagttataaggtatg atggaattaataaatactatgcagactccgtgaagggccg attcatcatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgt attactgtgcgagcgggccccctgatgcttttaatatctg gggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagctagcacc aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaaga gcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaa ggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcc tacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgc aacgtgaatcacagccagcaacaccaaggtggacaaga gagttgagcccaaatcttgtagacaaaactcacacatgccc accgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatct cccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggagg agcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcac cgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag

SEQ ID	Описание	Последовательности
		tgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga aaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccaca ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatc ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggaca agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtccccgggt
64	Аминокислотная последовательность легкой цепи 16A5- MICA.52	AIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKP GKVPKSLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
65	Нуклеотидная последовательность легкой цепи 16A5- MICA.52	gccatccagttgaccagtcctccatcctccctgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtca gggcatcagcagtgctttagcctgggtatcagcagaaacca gggaaagtccctaagtcctgatctatgatgcctccagtt tggaaagtgggggtcccatcaagggttcagcggcagtggtatc tgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatatgtt acccgatcaccttcggccaagggaacagactggagattaa acgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtttgtgt gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaca gtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctaca gcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt gt

SEQ ID	Описание	Последовательности
66	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 24G11-MICA.54	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQM PGKGLEWLGI IHPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAIYYCAREGIAATPFQDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
67	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 24G11-MICA.54	gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagc ccggggagctctctgaagatctcctgtaaggggttctggata cagttttaccaactactggatcggtctgggtgcgccagatg cccgggaaaggcctggagtgggttggggatcatccatcctg gtgactcttataccagatacagcccgctcctccaaggcca ggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctac ctgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatat attactgtgcgagagaggggtatagcagcaactccctttga ctactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagct agcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcct ccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcct gggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtgg aactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccg ctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgt ggtgaccgtgccctccagcagcttggggcaccagacctac atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg acaagagagttgagcccaaattctgtgacaaaactcacac atgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccg tcagtcttctcttccccccaaaaccaaggacaccctca tgatctcccggaccctgagggtcacatgcgtgggtggga cgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactgggtac gtggacggcggtggagggtgcataatgccaagacaaagccgc

SEQ ID	Описание	Последовательности
		gggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgt cctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccca tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgaga accacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggct tctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctg gactccgacgggtccttcttctctatagcaagctcaccg tggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccctgtccccgggt
68	Аминокислотная последовательность легкой цепи 24G11- MICA.54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWFQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
69	Нуклеотидная последовательность легкой цепи 24G11- MICA.54	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtca gagtgttagcagctacttagcctgggtccaacagaaacct ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaaca gggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtggttc tgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct gaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaact ggctccgacgttcggccaagggaaggtggaaatcaa acgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtg gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaca gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctaca gcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc

SEQ ID	Описание	Последовательности
		ctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt gt
70	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 3F5- MICA.2	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfstysmnwvrqa pgkglewvsyisyrstiyadsvkgrftisrdnarnsly lqmnslrddetavyycarwgygsggfdywgggtlvtvssa stkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvsw nsgaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggp svflfpkpkdltlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngke ykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreem tknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvl dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhnytq kslsispq
71	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 3F5- MICA.2	gaggtgcaactggtggaatctgggggaggcttggtacagc ctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt caccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggct ccagggaaggggctggagtgggtttcatacattagttatc gtagtcgtaccatatactacgcagactctgtgaagggccg attcaccatctccagagacaatgccaggaaactcactgtat ctgcaaatgaacagcctgagagacgaggacacggctgtgt attactgtgcgagatggggctatgggttcggggggccttga ctactggggccagggaaccctgggtcacctctcctcagct agcaccaagggcccatcgggtcttccccctggcaccctcct ccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcct gggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtgg aactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccgg ctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgt ggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtgg acaagagagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacac atgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccg tcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctca tgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgga

SEQ ID	Описание	Последовательности
		cgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtac gtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgt cctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccca tcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgaga accacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggct tctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctg gactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccg tggaacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccctgtccccgggt
72	Аминокислотная последовательность легкой цепи 3F5- MICA.2	eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssy lawyqqk pgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrle pedfavyyccqygssftfgpgtkvdikrtvaapsvfifpp sdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq esvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqg lsspvtksfnrgec
73	Нуклеотидная последовательность легкой цепи 3F5- MICA.2	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtca gagtgttagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaa cctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatcca gcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtggt gtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag cctgaagatthttgcagtgtattactgtcagcagtatggta gctcattcacttttcggccctgggaccaaaagtggatatcaa acgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaca gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctaca gcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga

SEQ ID	Описание	Последовательности
		gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt gt
51	MICA человека	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETEEWTPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAVAGCC YFCYYYFLCPLL
109	MICA1 (вариант MICA)	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGS VQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETKEWTPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI FVIIIFYVRCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHR DATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA
110	MICA*002	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSGDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETEEWTPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI FVIIIFYVRCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHR DATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGT
111	MICA*004	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGQWAEDVLGNK

SEQ ID	Описание	Последовательности
		TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNVETEEWTVPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVV LRRRVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLSTR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAA AI FV I I I F Y V R C C K K K T S A A E G P E L V S L Q V L D Q H P V G T S D HRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
112	MICA*008	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETEEWTVPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTW QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICRGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI FV I I I F Y V R C C
113	MICA*009	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETEEWTVPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLW QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRF TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAI FV I I I F Y V R C C K K K T S A A E G P E L V S L Q V L D Q H P V G T S D H R DATQLGFQPLMSALGSTGSTEGT
114	MICA*010	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLPYNLTVLSWDGS VQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGQWAEDVLGNK TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCE IHEDNSTRSSQHFIYDGEFLSQNLETEEWTVPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVV LRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTW QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICRGEEQRF

SEQ ID	Описание	Последовательности
		TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAA IFVIIIFYVRCKKKTSAAGPELVSLQVLDQHPVGTSDH RDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
115	VH MICA.20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQA PGKGLEWVSYISYRSRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
116	VL MICA.20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
117	VH MICA.21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQA PGKGLEWVSYISYRSRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
118	VL MICA.21	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIK
119	VH MICA.22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQA PGKGLEWVSYISYRSRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
120	VL MICA.22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
121	VH MICA.38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQA PGKGLEWVSYISYRSRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
122	VL MICA.38	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSSFTFGPGTKVDIK
127	Нуклеотидная последовательность VK2 16A5-MICA.52	atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggcttctgc tgctctggctcccaggtgc cagatgtgccatccagttgacccagtcctccatcctccctg tctgcatctgtaggagacag agtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagcagt gctttagcctgggtatcagca gaaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgcc

SEQ ID	Описание	Последовательности
		tccagtttggaaagtggggt cccatcaagggttcagcggcagtgatctgggacagatttc actctcaccatcagcagcct gcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagttt aatagttaccattcacttt cgccctgggaccaaagtggatatcaaa
128	Аминокислотная последовательность VK2 16A5-MICA.52	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQFNSYPFT FGPGTKVDIK
130	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 19G6- MICA.36 (236G)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQA PGEGLWVALIWYDGSNKFYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
131	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 19G6- MICA.36 (236G)	caggtgcaactggtggagtctgggggaggcggtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggatt caccttcagtaactatgccatgcactgggtccgccaggct ccaggcgaggggctggaatgggtggcacttatatggtatg atggaagtaataaattctatggagactccgtgaagggccg cttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaatgaacagcctgagcgccgaggacacggctgtgt attactgtgcgagagaggggaagtgggcactactggggcca gggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcaccaagggc ccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggacagcgccctgggctgcctggtcaaggacta cttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcc

SEQ ID	Описание	Последовательности
		ctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagt cctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcc ctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttg agcccaaattcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtg cccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtccttcctc ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgga cccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacga agaccctgagggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtg gagggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagt acaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcacgcgtcct gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagg gtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta cacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcg acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaa caactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttctctctatagcaagctcacctgggacaagagca gggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgca tgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc ctgtccccgggt

[0530] Для выполнения на практике настоящего раскрытия будут использоваться, если не указано иное, традиционные методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантных ДНК и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, том I и II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Заявка на выдачу патента США № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.);

Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; серию научных публикаций Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, том 154 и 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, тома I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooks, Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) и Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0531] Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не ограничения.

Примеры

Пример 1. Получение и скрининг антител.

[0532] Трансгенных по IgG человека (Hco7:01 [J/K] (BALB/c)) мышей иммунизировали с использованием клеток CHO, трансфицированных полноразмерным МІСА/В человека. Клетки селезенки от иммунизированной мыши сливали с партнером по слиянию SP2/0. Супернатанты гибридомы сперва подвергали скринингу в отношении присутствия IgG-антител человека с применением HTRF-анализа. Затем определяли антигенную специфичность по связыванию с hMICA в ELISA, с последующими FACS-анализами с использованием клеток CHO, экспрессирующих различные аллельные варианты МІСА/В человека. Такие FACS-положительные mAb подвергали дополнительному определению характеристик в отношении аффинности и эффективности в функциональных анализах. Гибридомы 3F5, 16A5, 71C2, 19G6 и 24G11 представляли собой репрезентативные клоны, продуцирующие антитела.

Пример 2. Рекомбинантная экспрессия антител к МІСА/В

[0533] Описанные в настоящем документе антитела к МІСА/В могут быть экспрессированы с применением широко распространенных в данной области методик клонирования и рекомбинантной экспрессии. Например, получали общую РНК из клона гибридомы 3F5 и получали кДНК VH и VK. Вариабельные области тяжелых (VH) и легких (VL) цепей антитела клонировали и секвенировали (фигуры 4A и 4C соответственно). Последовательность, кодирующую VH 3F5 (SEQ ID NO: 31), клонировали в вектор pICOFSCpurG, который содержит сигнальную последовательность остеонектина и константную область IgG.1f человека, с получением плазмиды pICOFSCpurG(MICA.2).

Последовательность, кодирующую VL 3F5 (SEQ ID NO: 33), клонировали в вектор pICOFSCneoK, который содержит сигнальную последовательность остеонектина и константную область каппа-цепи человека, с получением плазмиды pICOFSCneoK(MICA.2). С использованием плазмид pICOFSCpurG(MICA.2) и pICOFSCneoK(MICA.2) проводили контрансфекцию клеток CHO-S, и стабильные клоны отбирали и подвергали скринингу в отношении рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантное антитело 3F5 называется «MICA.2». Мутации в VL, например, CDR3 MICA.2, выполняли с целью улучшения растворимости антитела. Такие мутанты MICA.2 включают MICA.20 (VH: SEQ ID NO:115; VL: SEQ ID NO:116), MICA.21(VH: SEQ ID NO:117; VL: SEQ ID NO:118), MICA.22 (VH: SEQ ID NO:119; VL: SEQ ID NO:120), MICA.38 (VH: SEQ ID NO:121; VL: SEQ ID NO:122), MICA.39 (VH: SEQ ID NO:123; VL: SEQ ID NO:124) и MICA 40 (VH: SEQ ID NO:125; VL: SEQ ID NO:126). Эти мутанты предусматривают мутации или вставки по положению 96, или вблизи него, в VL MICA.2.

[0534] Антитела, содержащие CDR и/или вариабельные домены продуцированных гибридомой антител 19G6 (MICA.36; см. фигуры 1А и 1С касательно VH и VL соответственно), 16A5 (MICA.52 (фигуры 2А и 2С касательно VH и VL соответственно) и MICA.53) и 24G11 (MICA.54; см. фигуры 3А и 3С касательно VH и VL соответственно), также экспрессировались рекомбинантно в клетках-хозяевах. Рекомбинантные антитела в настоящем документе упоминаются под такими названиями, как MICA.36 (19G6), MICA.52 и MICA.53 (16A5), и MICA.54 (24G11). При упоминании любого из этих рекомбинантных антител по их названиям не упоминается конкретная константная область, т. е. антитела MICA.2, MICA.20, MICA.21, MICA.22, MICA.36, MICA.38, MICA.39 и MICA.40, MICA.52, MICA.53, и MICA.54 могут иметь любую требуемую константную область. Мутацию G236A (согласно нумерации EU) выполняли в константной области тяжелой цепи MICA.36 с целью создания антитела MICA.36-G236A. Экспрессию нефукозилированного антитела к MICA/B MICA.36-IgG1-NF-G236A обеспечивали при помощи клонирования последовательностей MICA.36-G236A в нокаутные по FUT8 клетки CHO (клетки POTELLIGENT[®]), доступные от BioWa, Inc. (Принстон, Нью-Джерси).

Пример 3. Аффинность связывания антител к MICA/B к аллельным вариантам MICA человека, определенная с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

[0535] Кинетические показатели и аффинность антител к MICA/B в отношении аллельных вариантов MICA человека определяли на приборе Biacore T200 при 37°C с использованием подвижного буфера, pH 7,4, (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20, 1 мг/мл BSA). Антитела к MICA/B

захватывали на покрытых α -Fc человека поверхностях. Аллельные варианты MICA в качестве антигенов инъецировали в высоких и низких наномолярных концентрациях (500 нМ и 50 нМ, за исключением случаев, когда указано иное). Результаты для антител MICA.36 и MICA.38 (MICA.2 с Ser, вставленным между остатками 95 и 96 в легкой цепи) показаны в таблице 2 ниже. Результаты аппроксимации кинетических кривых для аллельных вариантов MICA антител MICA.36 и MICA.38 показаны на фигурах 6А-6Н.

Таблица 2. Аффинность антитела к аллельным вариантам MICA согласно SPR.

Антитело	Аллельный вариант MICA (антиген)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (нМ)
MICA.36hIgG1	MICA*002	2,86E+04	1,61E-02	> 250 (>1/2 наивысшей концентрации аналита)
	MICA*004	4,62E+04*	6,37E-04*	6,2-13,8
		9,52E+04	5,91E-04	
	MICA*008	1,20E+05*	6,06E-04*	4,0-5,1
		1,40E+05	5,65E-04	
	MICA*009	5,41E+04*	6,42E-04*	8,6-11,9
		7,01E+04	6,03E-04	
MICA.38_3F5_S95k	MICA*002	1,03E+06	1,27E-01	123
	MICA*004	4,10E+05	4,26E-02	104
	MICA*008	6,00E+05	7,80E-02	130
	MICA*009	3,97E+05	5,02E-02	126

* Эти результаты получали с применением 100 нМ и 10 нМ концентраций антигена.

[0536] Кинетические показатели и аффинность антител к MICA/B MICA.2, 19G6, 16A5 и 71C2 в отношении аллельных вариантов MICA человека (аллельные варианты huMICA-his *002, *004, *008 и *009) также определяли на приборе Biacore 3000 с применением следующих условий:

- Подвижный буфер: подвижный буфер HES-EP
- Чип: чип CM5 с белком G, Fc1: холостая проба. Fc2-4: ~200 OE
- Ab: 5 мкг/мл, 10 мкл при 10 мкл/мин
- Связывание Ag: ассоциация в течение 5 мин, диссоциация в течение 7 мин при 25 мкл/мин,

- Восстановление: глицин 1,7, 10 мкл при 100 мкл/мин с последующей промывкой в течение 60 с HES-EP

[0537] Результаты анализа с применением системы Biacore показаны в таблице 3 ниже. Результаты аппроксимации кинетических кривых для аллельных вариантов MICA для MICA.2, 19G6, 16A5 и 71C2 показаны на фигурах 6I-6L.

Таблица 3. Аффинность антитела к аллельным вариантам MICA согласно SPR.

Антитело	Аллельный вариант MICA (антиген)	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)
MICA.2	MICA*002	27,5	3,80	10,4
	MICA*004	54,6	5,21	28,4
	MICA*008	40,5	6,09	24,6
	MICA*009	61,5	3,77	23,2
19G6	MICA*002	219	0,37	8,14
	MICA*004	9,78	2,34	2,28
	MICA*008	5,23	3,58	1,87
	MICA*009	13,7	1,57	2,15
16A5	MICA*002	147	0,71	10,4
	MICA*004	6,89	2,50	1,72
	MICA*008	4,55	3,79	1,72
	MICA*009	12,9	1,66	2,15
71C2	MICA*002	3010	0,03	11,6
	MICA*004	262	1,15	30,3
	MICA*008	39,9	2,72	10,9
	MICA*009	1400	0,23	32,5

Пример 4. Аффинность связывания антител к MICA/B в отношении MICA/B человека и яванского макака, определенная с помощью анализа по Скэтчгарду.

[0538] Антитело MICA.36 метили радиоактивным иодом с использованием $^{125}\text{I-Na}$ (1 мКи; NEZ033H001 MC по каталогу PerkinElmer) с применением реагента для твердофазного йодирования IODO-GEN[®] (1,3,4,6-тетрахлор-3а-6а-дифенилгликоурил; Pierce, 28601 по каталогу). Избыток иода удаляли с применением колонки для высаливающей хроматографии (Pierce, 43243 по каталогу). Фракции меченного антитела

собирали и анализировали на предмет радиоактивности на счетчике гамма-излучения Wizard 1470. Концентрацию антитела ^{125}I -MICA.36 в каждой фракции рассчитывали с применением флуориметра Qubit от Invitrogen. Радиохимическую чистоту устанавливали с помощью тонкослойной хроматографии белка с пиковой концентрацией и радиоактивных фракций (Pinestar Technology, 151-005 по каталогу).

[0539] Связывание меченного радиоактивным иодом антитела MICA.36 с MICA/B человека, эндогенно экспрессирующимся на поверхности клеток 786-0 и SW480, а также клеток CHO, трансдуцированных MICA человека, MICB человека или MICA/B яванского макака, было продемонстрировано с помощью инкубирования клеток с титрованием ^{125}I -MICA.36. Неспецифическое связывание определяли путем связывания в присутствии титрования 100-кратного молярного избытка немеченного антитела и вычитали из общего числа импульсов в минуту (CPM) для расчета специфического связывания. Линейную калибровочную кривую зависимости концентрации ^{125}I -MICA.36 от CPM применяли для экстраполяции специфической активности, максимума связывания ^{125}I -MICA.36 в нМ и расчета, таким образом, числа рецепторов на клетку.

[0540] Специфическую активность меченного иодом MICA.36 определяли путем нанесения титров антитела против ассоциированных CPM на калибровочную кривую (фиг. 7A). Специфическая активность была рассчитана как 164214 CPM на 1 нМ ^{125}I -MICA.36. Число рецепторов на клетку рассчитывали с помощью следующего уравнения: $(B_{\text{max}}) \times (\text{число Авогадро}) \times (\text{анализируемый объем}) / \text{№ клеток на лунку}$.

[0541] Из результатов видно, что антитело MICA.36 характеризуется аффинностью приблизительно 1-2 нМ в отношении сверхэкспрессированного MICA человека*008 (фиг. 7B) и MICB*005 (фиг. 7C) на поверхности клеток CHO, аффинностью приблизительно 5-11 нМ в отношении сверхэкспрессированного MICA/B яванского макака (фигуры 7D и 7E) и аффинностью приблизительно 0,4 нМ в отношении MICA/B человека, эндогенно экспрессированного на поверхности клеток 786-0 (фиг. 7F) и SW480 (фиг. 7G).

Пример 5. Связывание антител к MICA/B с MICA/B человека клеточной поверхности и перекрестная реактивность с молекулами MICA/B яванского макака в проточной цитометрии.

[0542] Серийные разведения mAb MICA.36-IgG1-NF-G236A инкубировали с клетками CHO, трансдуцированными распространенными аллельными вариантами MICA/B человека или клеточными линиями опухолей человека, которые эндогенно экспрессируют MICA/B. Затем клетки дважды промывали и связанные с клетками антитела выявляли с применением вторичного антитела к антителу человека, конъюгированного с флуорофором. Анализы с использованием проточной цитометрии проводили с

применением проточного цитометра FACSCantoII или FACS Fortessa X-20. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции связывания mAb MICA.36-IgG1-NF-G236A с клетками определяли с применением программного обеспечения для анализа FlowJo. Получали кривые зависимости «доза-эффект» и рассчитывали значения EC50 с применением программного обеспечения Prism.

[0543] Для измерения перекрестной реактивности с молекулами MICA/B яванского макака (макака-крабоеда) серийные разведения mAb MICA.36-IgG1-NF-G236A инкубировали с клетками CHO, трансфицированными двумя клонами MICA/B яванского макака. Связанное с клеткой антитело выявляли с применением вторичного антитела к антителу человека, конъюгированного с флуорофором. Анализы с использованием проточной цитометрии проводили с применением Fortessa X-20. После гейтирования с использованием параметров FSC-SSC-7AAD с целью исключения сигналов дебриса и мертвых клеток определяли среднюю интенсивность флуоресценции mAb MICA.36-IgG1-NF-G236A с применением программного обеспечения для анализа FlowJo.

[0544] В эксперименте с проточной цитометрией для титрования mAb 19G6 с использованием клеток CHO, эктопически экспрессирующих распространенные аллельные варианты MICA/B человека, было показано, что 19G6 хорошо связывается с молекулами нативного MICA/B человека. Данные показаны на фигурах 8А и 8В.

[0545] Перекрестная реактивность 19G6 с MICA/B яванского макака была продемонстрирована связыванием 19G6 с двумя клонами MICA/B яванского макака, которыми были трансфицированы клетки CHO. В экспериментах с проточной цитометрией 19G6 хорошо связывалось с CHO с клоном №4 MICA макака-крабоеда и клоном №6 MICA макака-крабоеда. Данные одного репрезентативного эксперимента показаны на фиг. 8С. EC50 составляло 1,08 нМ для клона №4 макака-крабоеда и 22,02 нМ для клона №6 макака-крабоеда, что указывает на то, что 19G6 связывает MICA/B яванского макака с эффективностью, подобной таковой для MICA/B человека.

[0546] MICA.36-IgG1-NF-G236A связывалось с эндогенно экспрессируемым MICA/B в ряде клеточных линий опухолей человека (фиг. 8В). Значения EC50 для связывания с клетками клеточных линий опухолей человека, экспрессирующими аллельные варианты MICA (в скобках), 786-0 (*008), HeLa (*008), A2058 (*008/*018) и RPMI-8226 составляли 1,37 нМ, 1,76 нМ, 5,4 нМ и 3,90 нМ соответственно.

[0547] Другие антитела к MICA/B, например, 24G11, 71C2, 16A5 (№1 и №2 происходят из двух линий гибридомы от одного и того же клона), тестировали с применением такого же способа (таблицы 4 и 5 ниже) (фиг. 8D-8H)

[0548] Таблица 4. EC50 (нМ) антител к МІСА/В для распространенных аллельных вариантов МІСА/В человека и МІСА/В яванского макака.

Ab	*002	*004	*008	*009	*010	МІСВ	№4 макака- крабоеда	№6 макака- крабоеда
МІСА.2	5,367	2,938	2,138	1,56	6,912	5,996	1,967	4,011
24G11	1065	517,5	247,7	496,9	722,5	262,2	394,5	330,6
71C2	264,3	26,21	10,03	10,15	80,01	9,813	23,43	231,7
19G6	151,7	11,39	9,229	8,21	18,48	1,826	1,076	22,02
16A5 (№1)	25,32	1,043	2,219	0,9019	15,15	8,159	0,856	9,256
16A5 (№2)*	613,6	65,25	394,6	122,1	246,5	21,62	2,384	13,77

Таблица 5. EC50 (нМ) антител к МІСА/В для МІСА/В, эндогенно экспрессируемого в клеточных линиях опухолей человека.

	FACS EC50 (нМ)			
Ab	786-O	A2058	HeLa	RPMI-8226
МІСА.2	4,951	2,609	1,738	41,89
24G11	146,7	260,7	192,3	103,9
71C2	13,75	33,54	10,15	36,92
19G6	1,369	5,394	1,756	3,891
16A5 (№1)	2,484	7,685	3,761	7,998
16A5 (№2)	11,63	10,95	16,2	2,442

Пример 6. Сортировка антител к МІСА/В.

[0549] Эксперименты по сортировке проводили на приборе Octet HTX при 25°C в HEPES-буферном солевом растворе (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20 и 1 мг/мл BSA). Антитела к МІСА/В и NKG2D-mFc захватывали на покрытых антителами к Fc кончиках сенсоров, а остальные сайты захвата блокировали избытком IgG в качестве отрицательного контроля. Рекомбинантный растворимый МІСА (аллельный вариант 8) связывался, а затем проверяли связывание («сэндвич»-связывание) антител к МІСА/В.

[0550] Тестируемые антитела попали в две неперекрывающиеся эпитопные группы. Представители каждой из групп не могут связываться с МІСА одновременно (что указывает на перекрывающиеся эпитопы), а представители из разных групп – могут.

[0551] Результаты экспериментов по сортировке представлены в таблице 6. Антитела MICA.2, MICA.38, MICA.39 и MICA.40 находились в одной эпитопной группе. Антитела 24G11 (MICA.54) и MICA.36 составляли вторую группу с неперекрывающимися эпитопами. Эти антитела не блокировали связывание NKD2D с MICA.

Таблица 6. Сортировка антител к MICA/B.

Лиганд (Ab)	MICA.2	MICA.38	MICA.39	MICA.40	24G11	MICA.36
MICA.2	0	0	0	0	1	1
MICA.38	0	0	0	0		1
MICA.39	0	0	0	0		1
MICA.40	0	0	0	0		1
24G11	1	1	1	1	0	0
MICA.36	1	1	1	1	0	0

(«0» = одновременное связывание отсутствует; «1» = одновременное связывание)

Пример 7. Картирование эпитопов с помощью HDX.

[0552] Масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), в режимах как обычного, так и высокого разрешения, использовали для изучения связывания эпитопов MICA с mAb MICA.2, MICA.39, MICA.40, MICA.36 NF G236A и MICA.36.

[0553] HDX-MS позволяет исследовать конформацию белка и динамику конформационных превращений в растворе путем отслеживания скорости и степени водородно-дейтериевого обмена атомов водорода при амидной связи остова. Уровень HDX зависит от доступности растворителя для атомов водорода при амидной связи остова и водородных связей белка. Увеличение массы белка после HDX можно точно измерить с помощью MS. При сочетании этой методики с ферментативным расщеплением, можно анализировать структурные признаки на уровне пептида, что позволяет дифференцировать экспонированные на поверхности пептиды от таковых, свернутых внутри молекулы. Добавление фрагментации в газовой фазе для выбранных областей пептида с помощью MS обеспечивает получение данных HDX высокого разрешения на уровне аминокислот. Как правило, проводят мечение дейтерием и последующие эксперименты по остановке реакции, с последующим ферментативным расщеплением, разделением пептида и MS-анализом.

[0554] Перед проведением экспериментов по картированию эпитопов осуществляли эксперименты без дейтерирования для получения списка общих пептидов для рекомбинантного полноразмерного внеклеточного домена (ECD) His-меченного MICA человека (аллельный вариант 08, 15 мкМ), полученного в собственной лаборатории, и белкового комплекса MICA и mAb (молярное соотношение 1:1). В HDX-MS-эксперименте 5 мкл каждого образца (MICA или MICA с mAb) разводили в 55 мкл буфера с D₂O (10 мМ

фосфатный буфер, D₂O, pH 7,0) для начала реакций мечения. Реакции протекали в течение разных периодов времени: 20 сек, 1 мин, 10 мин и 240 мин. По окончании каждого периода времени реакции мечения реакцию останавливали путем добавления буфера для остановки реакции (1 М ТЕСР в 8 М мочеvine, pH 2,5, 1:1, об/об) и 50 мкл образца, в котором останавливали реакцию, вводили в систему Waters HDX-MS для проведения анализа. Уровни поглощения дейтерия для расщепленных пепсином общих пептидов отслеживали в отсутствие/присутствии mAb к MICA/B. В случае HDX-экспериментов с высоким разрешением дифференциальный HDX отслеживали между MICA и MICA с Fab антитела MICA.36, и области пептидов в MICA, для которых показано значимое снижение уровня HDX после связывания с Fab антитела MICA.36, дополнительно подвергали фрагментации с помощью MS/MS. Уровни поглощения дейтерия для аминокислотных остатков отслеживали в отсутствие/присутствии Fab MICA.36.

[0555] Результаты анализа данных HDX-MS по MICA.2 (фиг. 9A), MICA.39 (фиг. 9B) и MICA.40 (фиг. 9C) для MICA указывают на то, что все три mAb имеют идентичные эпитопы связывания, состоящие из двух областей MICA:

[0556] Область 1: ²⁰¹LRRTVPPMVNVTRSEASEGN²²⁰ (SEQ ID NO: 56)

[0557] Область 2: ²³⁸TWRQDGVSLSHDTQQ²⁵² (SEQ ID NO: 57)

[0558] Исходя из различий относительного поглощения дейтерия, область 2 характеризуется наиболее значимыми изменениями в поглощении дейтерия.

[0559] Результаты анализа данных по MICA.36 NF G236A и MICA.36 для MICA указывают на то, что обе молекулы характеризуются идентичными эпитопами, которые состоят из трех областей MICA (фигуры 9D и 9E). Удаление фукозы и мутация G236A не оказывают влияния на связывание эпитопа.

[0560] Область 1: ¹⁵⁰WTVPQSSRAQTLAM¹⁶³ (SEQ ID NO: 52)

[0561] Область 2: ²³¹YPRNIILT²³⁸ (SEQ ID NO: 53)

[0562] Область 3: ²⁵³WGDVLPDGNNGTYQTW²⁶⁷ (SEQ ID NO: 55)

[0563] Исходя из различий относительного поглощения дейтерия, три области пептидов могут быть ранжированы как область 3 > 2 > 1, при этом область 3 характеризуется наиболее значимыми изменениями в поглощении дейтерия.

[0564] Результаты этого HDX-исследования указывают на то, что стабилизация вариантов MICA.2 (MICA.39 и MICA.40) обеспечивает сохранение идентичных эпитопных карт для MICA.2. Эпитоп связывания MICA.36 на MICA был охарактеризован как содержащий прерывистые области связывания: ¹⁵⁰WTVPQSSRAQTLAM¹⁶³ (SEQ ID NO: 52), ²³¹YPRNIILT²³⁸ (SEQ ID NO: 53) и ²⁵³WGDVLPDGNNGTYQTW²⁶⁷ (SEQ ID NO: 55), и удаление фукозы и мутация G236A не оказывают влияния на связывание эпитопа.

[0565] В HDX-экспериментах с высоким разрешением с применением Fab MICA.36 для фрагментации в газовой фазе были выбраны области 2 и 3 эпитопа MICA.36, исходя из уровней снижения HDX. Результаты HDX с высоким разрешением обеспечивают возможность уточнения эпитопов:

[0566] Область 1: ¹⁵⁰WTVPQSSRAQTLAM¹⁶³ (SEQ ID NO: 52)

[0567] Область 2: ²³⁴N, ²³⁷L

[0568] Область 3: ²⁵⁵DVLPDGNGTYQ²⁶⁵ (SEQ ID NO: 54), ²⁶⁷W

[0569] На фиг. 9F показаны эти остатки, наложенные на кристаллическую структуру MICA, связанного с NKG2D.

Пример 8. Картирование эпитопов с помощью дрожжевого дисплея.

[0570] Библиотеку MICA-ECD-клонов получали с применением набора для мутагенеза Genemorph II. Эта библиотека мутантных молекул MICA-ECD была представлена на поверхности *S. cerevisiae* под контролем индуцируемого галактозой промотора, с применением С-концевого слияния с тус-Aga1. Индуцируемые галактозой дрожжевые клетки метили сперва 100 нМ антител человека к MICA/B и 100 нМ антитела мыши к тус 9E10. Затем клетки метили PE-конъюгированными антителами козы к антителам человека и Alexa-633-конъюгированными антителами козы к антителам мыши. Для выделения популяций из библиотеки, которые блокируют взаимодействие антитело-антиген, меченые клетки, для которых было показано хорошее связывание с антителом к тус, но сниженное связывание с антителами к MICA/B, подвергали сортировке с применением сортировки клеток с активированной флуоресценцией. Подвергнутые сортировке популяции клеток затем выращивали и обогащали для другого раунда мечения и сортировки, как описано выше. ДНК выделяли из подвергнутых сортировке клеток после второго раунда и исходной библиотеки. Образцы ДНК готовили для NGS-секвенирования с применением набора для получения библиотек ДНК Nextera XT, объединяли и секвенировали с применением NGS-секвенирования с использованием системы Miseq. Полученные в результате прочтения ДНК-последовательностей анализировали с целью идентификации последовательностей, обнаруженных в подвергнутых сортировке популяциях, которые являются особенно обогащенными в сравнении с исходной библиотекой. Эти обогащенные мутантные варианты накладывали на структуру комплекса MICA-NKG2D (PDB ID: 1HYR), и для них наблюдали четко определенные участки на поверхности белка (фигуры 10D-10F). Антитела MICA.36, MICA.2 и 24G11 (MICA.54) связывались с доменом $\alpha 3$ MICA. Эпитопы были следующими:

[0571] MICA.36: G254, D255, L257, Y264, W267 (фиг. 10A)

[0572] MICA.2: R240, Q241, D242, V244, R279 (фиг. 10B)

[0573] 24G11: P258, G260, G262, Y264 (фиг. 10C)

Пример 9. Сохранение поверхностного МІСА и снижение уровня растворимого МІСА (sMICA) in vitro с помощью антитела к МІСА/В.

[0574] Линии клеток, отличных от человеческих, которые эктопически экспрессируют МІСА/В, культивировали в течение 48 часов с МІСА.36-IgG1-NF-G236A или изотипическим контролем. После культивирования клетки собирали и измеряли уровень поверхностного МІСА/В с помощью окрашивания антителом к МІСА/В, клон 6D4. Собирали супернатант и измеряли уровень растворимого МІСА (sMICA) с применением набора для ELISA МІСА (Abcam ab100592). МІСА.36-IgG1-NF-G236A обеспечивало повышение уровня поверхностного МІСА на поверхности клеток, измеряемого с помощью проточной цитометрии (фигуры 11A-11D), и снижение количества sMICA в супернатанте культуры, определенного с помощью ELISA (фиг. 12A-12D), по сравнению с изотипическим контролем (IgG1 NF).

[0575] Кроме того, в течение 48 часов с МІСА.36-IgG1-NF-G236A или изотипическим контролем культивировали клеточные линии человека, которые эндогенно экспрессируют МІСА. После культивирования клетки собирали и измеряли уровень поверхностного МІСА/В с помощью окрашивания антителом к МІСА/В, клон 6D4. МІСА.36-IgG1-NF-G236A обеспечивало повышение уровня поверхностного МІСА на поверхности клеток, измеряемого с помощью проточной цитометрии (фигуры 13A-13E), и снижение количества sMICA в супернатанте культуры, определенного с помощью ELISA (фиг. 14A-14C). Таким образом, МІСА.36-IgG1-NF-G236A обеспечивает сохранение МІСА/В на поверхности опухолевых клеток и приводит к снижению количества sMICA/В. Значения EC50 (нМ) для сохранения МІСА и снижения количества sMICA IC50 (нМ) показаны в таблице 7.

Таблица 7. Сохранение поверхностного МІСА и снижение количества sMICA.

Клеточная линия	Аллельный вариант МІСА	EC50 связывания (нМ)	Сохранение МІСА EC50 (нМ)	Кратность повышения поверхностного МІСА	Снижение уровня sMICA EC50 (нМ)	% уменьшения уровня sMICA
786-О	008	1,37	0,057	1,47	0,14	66
HELA	008	1,76	0,032	1,43	0,10	32
A2058	008/018	5,4	0,093	2,41		15
HCT116	001/009	0,37	0,043	1,98	0,075	62

Пример 10. Для MICA.36-IgG1-NF-G236A показана повышенная аффинность к CD16a и CD32a.

[0576] Для MICA.36-IgG1-NF-G236A, нефукозилированного (NF) IgG1-антитела человека, предусматривающего внесенную мутацию в тяжелой цепи, G236A, была показана более высокая аффинность к CD16a (FcγRIIIa) и CD32a (FcγRIIa), чем у нативного IgG1. Связывание FcγR человека с MICA.36-IgG1-NF-G236A исследовали с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и сравнивали с антителами MICA.36 с IgG1 дикого типа человека, изотипами IgG1f-G236A и IgG1f-NF, а также контрольными не связывающими MICA IgG1 человека и NF-антителами. Для этих исследований белок A иммобилизовали на проточных ячейках 1-4 сенсорного чипа CM5 с применением стандартных химических реакций с этил(диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC)/N-гидроксисукцинимидом (NHS), с блокированием этаноламином, в подвижном буфере, состоящем из 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества p20, с достижением плотности ~3000 OE. Антитела в концентрации 3 мкг/мл захватывали на поверхности белка A с достижением плотности ~200–400 RU и тестировали связывание FcγR в качестве аналитов в подвижном буфере, состоящем из 10 mM NaPO₄, 130 mM NaCl, 0,05% p20, буфера (PBS-T), pH 7,1, при 25°C, с применением промежутка времени ассоциации 120 с и промежутка времени диссоциации 180 с при скорости потока 30 мкл/мин. Для определения кинетических показателей и аффинности связывания проводили тестирование с использованием серии концентраций FcγR (разведение 3:1) от 1 мкМ до 0,15 нМ (белки CD64) или от 10 мкМ до 1,5 нМ (все другие FcγR). Данные по кинетике были аппроксимированы к ленгмюровской модели связывания 1:1 или к равновесной модели связывания с применением программного обеспечения для анализа данных Biacore T200.

[0577] В таблице 8 представлены повышенные показатели аффинности связывания MICA.36-IgG1-NF-G236A с аллельными вариантами CD16a и CD32a, как измерено с помощью SPR.

Таблица 8. Значения аффинности в отношении FcγR человека в методе поверхностного плазмонного резонанса.

Антитело	hCD16a- V158	hCD16a- F158	hCD32a- H131	hCD32a- R131

MICA.36-IgG1-NF-G236A	31	420	140	220
MICA.36 IgG1	360	>5000	780	1300
MICA.36 IgG1 NF	8	140	730	770
G236A IgG1 MICA.36	850	>5000	130	260
IgG1 в качестве контроля	480	>5000	1000	1700
IgG1 NF в качестве контроля	9,1	170	860	860

Пример 11. MICA.36-IgG1-NF-G236A опосредовало усиленный антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и перекрестное представление антигенов.

[0578] Дендритные клетки (DC) обладают способностью к поглощению опухолевых клеток, процессированию и представлению опухолевого антигена, а также примированию опухолеспецифических Т-клеточных ответов. Было показано, что опсонизация экспрессирующих MICA/B клеточных линий опухолей антителом к MICA/B может усиливать перекрестное представление опухолевого антигена дендритными клетками и последующее примирование антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток (Groh, V., PNAS 2005;102:6461-6). Антитело MICA.36-IgG1-NF-G236A оценивали в отношении ADCP и перекрестного представления антигенов. В качестве эффекторов применяли происходящие из костного мозга дендритные клетки (BMDC) от трансгенных по Fc человека мышей (линия мышей, у которой удалены все FcγR мыши и вставлены FcγR человека, кодируемые как трансгены, что обуславливает рекапитуляцию экспрессии FcγR человека) (Smith, P., et al., 2013, Proc Natl Acad Sci USA.;109:6181-6). Для получения BMDC у трансгенных по Fc человека мышей выделяли костный мозг и культивировали его *in vitro* с mGM-CSF (10 нг/мл) и mIL-4 (5 нг/мл), и половину среды заменяли в день 2 и день 4. BMDC собирали в день 5. Как правило, более 80% общего пула клеток были CD11c-положительными по результатам окрашивания в рамках проточной цитометрии, что указывает на надлежащую индукцию BMDC. В качестве целевых клеток применяли клетки меланомы B16.F10, трансдуцированные MICB, GFP и Ova, называемые клетками B16.F10-MICB-GFP-ova.

[0579] Для ADCP-анализа клетки B16.F10-MICB-GFP-ova опсонизировали с помощью Ab MICA.36 в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки облучали для остановки роста и инкубировали с BMDC в течение 24 часов, после чего культуру окрашивали антителом к CD11c мыши и оценивали фагоцитоз с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз рассчитывали как процентную долю CD11c⁺ GFP⁺ клеток от общего пула

CD11c⁺ дендритных клеток. Усиленный ADCP наблюдали при использовании G236A-вариантов антитела (MICA.36-IgG1-NF-G236A и MICA.36 IgG1 G236A), по сравнению с IgG1 или IgG1 NF-вариантами MICA.36 (фиг. 15A). Измеренное EC50 составляло 10,7 нМ для MICA.36-IgG1-NF-G236A в том случае, когда в качестве эффекторов применяли BMDC от трансгенных по FcγR человека мышей, а в качестве целевых клеток применяли клетки B16-MICB-GFP-Ova.

[0580] В случае анализа перекрестного представления антигенов, пролиферация специфических в отношении антигена ova OT-I CD8⁺ Т-клеток является показателем того, насколько эффективно BMDC процессируют и перекрестно представляют антиген ova из клетки B16.F10-MICB-GFP-ova CD8⁺ Т-клеткам.

[0581] Для измерения перекрестного представления антигенов, клетки B16.F10-MICB-GFP-ova опсонизировали антителом MICA.36 в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки облучали для остановки роста и инкубировали с BMDC в течение 24 часов. Затем CD8⁺ Т-клетки, выделенные из селезенок мышей OT-I (C57BL/6-Tg(TcrαTcrβ)1100Mjb/J, The Jackson Laboratory), метили CellTrace Violet и добавляли к культуре на 4 дня. Затем с помощью проточной цитометрии оценивали пролиферацию. Пролиферацию рассчитывали как процентную долю CD8⁺ Т-клеток с разведенным CellTrace Violet от общего пула CD8⁺ Т-клеток. Пролиферация OT-I CD8⁺ Т-клеток служит показателем того, насколько эффективно BMDC процессируют и перекрестно представляют пептид Ova CD8⁺ Т-клеткам. Усиленную пролиферацию OT-I CD8⁺ Т-клеток наблюдали при использовании MICA.36-IgG1-NF-G236A с EC50 1,6 нМ (фиг. 15A).

Пример 12. MICA.36-IgG1-NF-G236A опосредовало усиленную антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC).

[0582] Способность антител к MICA/B опосредовать ADCC-активность тестировали с применением NK-клеток человека в качестве эффекторов и клеток Raji, эктопически экспрессирующих MICA*009, или клеток меланомы A375, эндогенно экспрессирующих MICA, в качестве целевых клеток.

[0583] Целевые клетки высевали при плотности 5000 клеток/лунка (A375) или 10000 клеток/лунка (Raji-MICA) в 96-луночные белые планшеты с лунками с плоским дном (A375) или V-образным дном (Raji-MICA). Равный объем титрованных тестируемых или контрольных антител добавляли к целевым клеткам и инкубировали при 37°C в течение 2 дней.

[0584] На следующую день PBMC выделяли из образцов гепаринизированной цельной крови путем центрифугирования в градиенте плотности и промывали PBS, дополненным 2% FBS (HyClone). NK-клетки выделяли из пула PBMC с помощью

отрицательного отбора с применением набора для разделения на основе магнитных гранул (Miltenyi Biotec). Выделенные NK-клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде MYELOCULT™ (Stemcell Technologies), дополненной 500 МЕ/мл IL-2, и инкубировали в течение ночи при 37°C.

[0585] После инкубации в течение ночи активированные эффекторные NK-клетки дважды промывали в среде для анализа ADCC (RPMI-1640 с L-глутамином, без фенолового красного, дополненная 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG) и доводили до концентрации 5×10^5 клеток/мл. Целевые клетки, инкубированные с тестируемыми антителами, промывали и ресуспендировали в 100 мкл среды. Затем добавляли активированные эффекторные NK-клетки (100 мкл/лунка) с получением в результате конечного соотношения эффекторных клеток и целевых клеток (Е:Т) 10:1. Затем планшет помещали в инкубатор с увлажнением при 37°C на 4 часа.

[0586] В случае адгезивных клеток A375, содержащий NK-клетки супернатант удаляли и целевые клетки промывали средой перед добавлением 100 мкл среды. Готовили реагент CellTiter-Glo (Promega) и выдерживали его при комнатной температуре перед добавлением к целевым клеткам в объеме 100 мкл/лунка. Люминесценцию выявляли на планшет-ридере Envision, при этом интенсивность сигнала пропорциональна числу живых клеток. Процентную долю специфического лизиса клеток рассчитывали с применением формулы $[100 - ((\text{люминесценция образца} - \text{люминесценция максимального уничтожения}) / (\text{люминесценция спонтанного лизиса} - \text{люминесценция максимального уничтожения})) * 100]$.

[0587] В случае суспензионных клеток Raji-MICA, целевые и эффекторные клетки окрашивали по CD3 и CD56 (Biolegend) с использованием фиксируемого витального красителя (Fixable Viability Dye) eBioscience (Invitrogen) и считывали флуоресценцию с помощью проточного цитометра LSRFortessa (BD Biosciences). NK-клетки (CD3-, CD56+) исключали, а оставшиеся клетки оценивали в отношении гибели клеток (FVD+). Процентную долю специфического лизиса клеток рассчитывали с применением формулы [процент гибели клеток в образце – процент спонтанной гибели клеток].

[0588] Целевые клетки отдельно обеспечивали контроль спонтанного лизиса, тогда как целевые клетки, подвергнутые лизису с использованием 100 мкл/лунка 5% Tween-20 в качестве буфера для лизиса, отображали максимальное уничтожение в анализе. Процентную долю лизиса целевых клеток наносили на график для каждого антитела с применением программного обеспечения Prism v7 от GraphPad Inc.

[0589] Усиленную ADCC наблюдали при использовании NF-вариантов антитела (MICA.36-IgG1-NF-G236A и MICA.36 IgG1 NF), по сравнению с IgG1 или IgG1 G236A-вариантами MICA.36 (фигуры 16A и 16B).

Пример 13. Исследование эффективности в модели метастазирования B16.F10-MICA в легкие.

[0590] MICA/B человека распознается рецептором NKG2D мыши, что позволяет тестировать антитело к MICA/B в моделях на мышах с полностью иммунокомпетентными клетками. Полноразмерный белок MICA был эктопически экспрессирован в клеточных линиях меланомы B16F10, аденокарциномы толстой кишки MC38 и тимомы EG7-ova, и активность антитела MICA.36 либо с Fc человека (IgG1 NF G236A, IgG1 NF или IgG1), либо с Fc мыши (IgG2a или IgG1-D265A) оценивали с применением Tg-мышей с FcγR человека и линий мышей дикого типа (у которых экспрессируются FcγR мыши) соответственно.

[0591] В день 0 мышам (трансгенным по huFcγR мышам C57BL/6) делали внутривенную (IV) инъекцию с применением 200 мкл клеток B16.F10-MICA (клетки меланомы B16.F10, трансдуцированные MICA) в боковую хвостовую вену в концентрации 2×10^6 клеток/мл. В день 3 и день 8 животным делали внутрибрюшинную (IP) инъекцию MICA.36-IgG1-NF-G236A при 5 мг/кг. В день 14 извлекали легкие для измерения метастазирования опухоли из клеток B16.F10-MICA. Нефукозилированные IgG1-mAb человека (из собственной лаборатории) служили в качестве изотипического контроля.

[0592] Вкратце, легкие фотографировали с использованием линейки с метрической шкалой, расположенной в той же горизонтальной плоскости, что и легкие. С применением программного обеспечения ImageJ масштабировали изображения, корректировали цветобаланс, устанавливали пороговые значения и выбирали представляющую интерес область. Проводили определение размера частиц метастазов и их подсчет. Анализ производили по совокупной площади (мм²) метастазов на данной площади поверхности или по общему количеству метастазов на данной площади поверхности.

[0593] В день 14 собирали сыворотку крови и хранили ее при -20°C до измерения sMICA с применением набора для ELISA (Abcam ab100592).

[0594] Антитела MICA.36 с изотипом IgG1 NF (MICA.36-IgG1-NF-G236A и MICA.36 IgG1 NF) были эффективными в отношении снижения общей площади опухоли, образующейся из опухолевых клеток B16F10-MICA, а также уровня sMICA в сыворотке крови мышей, по сравнению с изотипическим контролем (см. фигуры 17A и 17B).

Пример 14. Исследования с повышением дозы в модели метастазирования B16.F10-MICA в легкие.

[0595] В день 0 мышам (трансгенным по huFcγR мышам C57BL/6) делали внутривенную (IV) инъекцию с применением 100 мкл клеток B16.F10-MICA в боковую хвостовую вену в концентрации 1×10^7 клеток/мл. В день 1 животным делали внутрибрюшинную (IP) инъекцию антитела в указанных концентрациях. В день 14 извлекали легкие для измерения метастазирования. Нефукозилированные IgG1-mAb человека (BMS) служили в качестве изотипического контроля.

[0596] Вкратце, легкие фотографировали с использованием линейки с метрической шкалой, расположенной в той же горизонтальной плоскости, что и легкие. С применением программного обеспечения ImageJ масштабировали изображения, корректировали цветобаланс, устанавливали пороговые значения и выбирали представляющую интерес область. Проводили определение размера частиц метастазов и их подсчет. Анализ производили по совокупной площади (мм²) метастазов на данной площади поверхности или по общему количеству метастазов на данной площади поверхности.

[0597] Из результатов двух отдельных исследований видно снижение общей площади опухоли у мышей, которым вводили MICA.36-IgG1-NF-G236A (MICA.36 NF G236A), по сравнению с изотипическим контролем (3 мг/кг) (фигуры 18A и 18B).

Пример 15. Эффективность MICA.36-IgG1-NF-G236A (MICA.36 NF G236A) у MICA-трансгенных мышей с опухолями EG7-MICA.

[0598] Для оценки терапевтической эффективности антитела к MICA/B у MICA-толерантных мышей, получали трансгенных мышей, где в предстательной железе мышей C57BL/6 экспрессировался MICA *009 человека под контролем промотора гена пробазина (MICA-трансгенные (Tg) мыши) (Liu, G. et al., 2013; J. Clin. Invest. 123, 4410-22). Самцы мышей MICA-Tg были способны переносить рост клеток MC38, эктопически экспрессирующих MICA (MC38-MICA), тогда как та же опухоль, имплантированная мышам C57BL/6 или Tg-мышам с FcγR человека, или самкам мышей MICA-Tg, в большинстве случаев отторгалась. Следовательно, после имплантации MC38-MICA у самцов мышей MICA-Tg наблюдали более низкую продукцию аутоантител к MICA человека по сравнению с таковой у мышей C57BL/6 дикого типа или Tg-мышей с FcγR человека. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что мыши MICA-Tg толерантны к белку MICA и опухолям, экспрессирующим MICA.

[0599] Эффективность антител к MICA/B оценивали с применением подкожной (SubQ) имплантации EG7, клеточной линии тимомы EL4, экспрессирующей высокие уровни MICA и пептид альбумина куриного яйца. Антитело MICA.36, либо с

функциональным Fc (MICA.36-mg2a, содержащее Fc мыши, которое больше всего похоже на IgG1 NF), либо с инертным Fc (MICA.36-mg1-D265A, предусматривающее мутацию в mIgG1, которое отменяет связывание с CD16 мыши), тестировали отдельно или в комбинации с антителом к PD-1.

[0600] День имплантации опухоли был отмечен как день 0 в исследовании. Трансгенным мышам B6.F10-MICA путем SubQ-инъекции вводили 100 мкл опухолевых клеток EG7-MICA в концентрации 5×10^7 клеток/мл (5×10^6 клеток/мышь). Спустя пять дней после имплантации мышей рандомизировали и начинали введение доз. Мышам путем внутрибрюшинной (IP) инъекции вводили указанное антитело (антитела) в дозе объемом 10 мл/кг каждого антитела один раз каждые 3 дня в общей сложности за 3 дозы. Тестировали нижеследующие антитела в различных комбинациях: mIgG1 к PD-1 мыши с мутацией Fc D265A, MICA.36 mIgG2a к антигену человека, MICA.36 mIgG1 к антигену человека с мутацией Fc D265A и изотипические контроли mIgG1 (MOPC-21, BioXCell) и mIgG2a mAb (C1.18.4, BioXCell).

[0601] Ответ опухоли определяли путем измерения опухолей с помощью штангенциркуля дважды в неделю до тех пор, пока опухоли не достигали заданного «целевого» размера 1 см^3 (фигуры 19А и 19В). Показатели объема опухоли $[\text{мм}^3]$ устанавливали из следующей формулы: объем опухоли $[\text{мм}^3] = (\text{длина} [\text{мм}] \times \text{ширина} [\text{мм}]^2)/2$.

[0602] Процент ингибирования роста опухоли (TGI%) для каждой группы обработки определяли с помощью расчета медианного отдельного TGI для этой группы (фиг. 19С). Отдельный TGI в день «t», рассчитанный для всех обработанных животных, определяли с помощью следующей формулы:

$$[1 - ((T_t/T_0)/(C_t/C_0))]/[(C_t - C_0)/C_t] * 100 \quad \text{[формула 1]}$$

[0603] Где T_t = отдельный размер опухоли обработанного животного в момент времени «t», T_0 = отдельный размер опухоли обработанного животного на момент первого измерения, C_t = медианный размер опухоли контрольных животных в момент времени «t», C_0 = медианный размер опухоли контрольных животных на момент первого измерения.

[0604] У животных, которые считались таковыми «без прогрессирования» в момент времени «t», наблюдали размеры опухоли (мм^3), которые в 4 раза меньше относительно таковых при исходном измерении (фиг. 19D).

[0605] Сыворотку крови собирали в день 11. Уровень sMICA в сыворотке крови измеряли с применением платформы Meso Scale Discovery (MSD) (фиг. 19Е). MICA.38 применяли в качестве захватывающего антитела, а MICA.2 применяли в качестве

детектирующего антитела. Антитела MICA.36 обеспечивали снижение sMICA в сыворотке крови по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 19E).

[0606] В то время как в этом исследовании MICA.36-mg2a не проявлял значительной активности в качестве монотерапии, в другом исследовании для указанного антитела был показан эффект в отношении ингибирования роста опухоли (пример 16). При этом комбинированная обработка MICA.36-mg2a/антителом к PD-1 обеспечивала усиленную регрессию опухоли и увеличенную продолжительность выживания по сравнению с обработкой одним антителом (фигуры 19C и 19D). После комбинированной обработки без опухоли (TF) были 70% мышей, тогда как после введения антитела MICA.36-mg2a и антитела к PD-1 по отдельности TF были 10% и 50% мышей соответственно. В соответствии с наблюдениями в моделях метастазирования легких, антитела MICA.36, отдельно или в комбинации с антителом к PD-1, обуславливали значимое снижение уровня sMICA в сыворотке крови (фиг. 19E). Усиленная противоопухолевая активность при комбинированной обработке MICA.36-mg2a/антителом к PD-1 была ассоциирована с повышенной инфильтрацией Т- и NK-клеток в опухоль, а также повышенным уровнем Ki67 и экспрессии маркеров активации на поверхности Т- и NK-клеток в дренирующих опухоль лимфатических узлах. MICA.36 с инертным Fc (MICA.36-mg1-D265A) не было активным ни в качестве монотерапии, ни в комбинации с антителом к PD-1 (хотя приводило к снижению уровня sMICA в сыворотке крови).

Пример 16. Исследования на трансгенных мышах B6-MICA in vivo.

[0607] В этом эксперименте трансгенным мышам B6-MICA путем подкожной (SubQ) инъекции вводили 100 мкл опухолевых клеток EG7-MICA. Спустя шесть дней после имплантации мышей рандомизировали и начинали введение доз. Мышам вводили комбинацию антител mIgG2a к CTLA4 мыши, MICA.36 mIgG2a к антигену человека и изотипический контроль mIgG2a mAb (C1.18.4, BioXCell) в дозе объемом 10 мл/кг каждого антитела один раз каждые 3 дня в общей сложности за 3 дозы, как описано в примере 15.

[0608] Антитело MICA.36 обеспечивало уменьшение объема опухоли и повышение TGI, отдельно и в комбинации с антителом к CTLA4 (фигуры 20A-20C). Для комбинации MICA.36 и антитела к CTLA4 было показано повышение выживаемости без прогрессирования по сравнению с обработкой одним антителом (фиг. 20D).

Пример 17. Исследования на трансгенных мышах B6-MICA in vivo.

[0609] Трансгенным мышам B6-MICA путем подкожной (SubQ) инъекции вводили 100 мкл опухолевых клеток EG7-MICA и обрабатывали следующими антителами, как описано в примере 16 (объем дозы 10 мл/кг каждого антитела один раз каждые 3 дня в общей сложности за 3 дозы): mIgG1 к PD-1 мыши с мутацией Fc D265A, MICA.36 mIgG2a

к антигену человека и изотипические контроли mIgG1 (MOPC-21, BioXCell), mIgG2a mAb (C1.18.4, BioXCell).

[0610] Антитело MICA.36 обеспечивало уменьшение объема опухоли и повышение TGI, отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 (фигуры 21A-21C). Комбинация MICA.36 и антитела к PD-1 обеспечивала повышение выживаемости без прогрессирования (фиг. 21D).

Пример 18. Растворимость антител к MICA/B

[0611] Экспрессия антител MICA.2 и MICA.36 в клетках CHO обеспечивалась с помощью рекомбинантных способов. Замороженный флакон на 1 мл с клоном MICA.36 CHO или клоном MICA.2 CHO размораживали для наращивания. Клеточную культуру инкубировали в среде CD для CHO, дополненной 8 мМ глутамином, $1 \times$ HT и 500 мкг/мл G418, в инкубаторе с заданными параметрами 37°C и 8% CO₂. Клетки сначала выращивали в колбах для культивирования на 250 мл в рабочем объеме 100 мл и наращивали до объема 2 л в двух колбах Фернбаха Corning на 3 л для периодического культивирования. Культуру инкубировали в течение 10 дней в ходе стадии продукции и проводили сбор, когда жизнеспособность падала ниже 40%. Культуру осветляли и фильтровали с использованием стерильного фильтра 0,8/0,2 мкм и отправляли на последующую обработку.

[0612] Супернатант клеточной культуры вносили колонку для аффинной хроматографии с использованием белка А, предварительно уравновешенную с помощью PBS при pH 7,5. Колонку промывали PBS (5 объемов колонки). Антитело элюировали с применением 0,1 М цитратного буфера при pH 3. Содержащую антитела фракцию сразу же нейтрализовали 2 М Tris-буфером при pH 8,5 с доведением до конечного pH 7,2. Затем антитело подвергали диализу против PBS или сахарозного буфера с гистидином. Антитело хранили при 4-8°C.

[0613] Для антитела MICA.2 была показана плохая растворимость. Оно характеризовалось мутностью в ходе стадий элюции и нейтрализации и значительным осаждением в ходе диализа и хранения даже в низкой концентрации (<2 мг/мл) при 4-8°C. Из-за осаждения имела место значительная потеря материала. Максимальная растворимость антитела MICA.2 составляла 2 мг/мл при нейтральном или слабокислом pH. Предпринятые меры по составлению не смогли привести к повышению растворимости антитела MICA.2 до более 15 мг/мл, что неприемлемо для производственных целей.

[0614] Антитело MICA.36 не характеризовалось мутностью в ходе всех стадий очистки и хранения в концентрациях 7,88 мг/мл при 4°C. Оно не осаждалось в ходе хранения в водном буфере при нейтральном или слабокислом pH даже в концентрациях

выше 7 мг/мл. Антитело MICA.36-NF-G236A, вариант антитела MICA.36, было стабильным в течение 3 месяцев при 40°C в концентрации 50 мг/мл.

[0615] Следовательно, антитела MICA.36 и MICA.36-NF-G236A, по сравнению с антителом MICA.2, характеризовались лучшими свойствами в отношении растворимости.

Пример 19. Картирование эпитопов с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

[0616] Экспрессия и очистка белка:

[0617] ECD MICA*02 был клонирован в вектор pVL1393 с N-концевым сигнальным пептидом мелиттина медоносной пчелы и C-концевой His₆-меткой и экспрессирован в клетках T.ni (EXPRESSION SYSTEMS). Тяжелая цепь и легкие цепи MICA.36 были клонированы отдельно в вектор pTT5 с N-концевым сигнальным пептидом остеонектина. Тяжелая цепь также была слита с C-концевой His₆-меткой. Fab MICA.36 был экспрессирован в суспензионных клетках Expi293. ECD MICA и Fab MICA.36 очищали с применением Ni-сефарозной смолы.

[0618] Кристаллизация и определение структуры:

[0619] Комплекс MICA.36:ECD MICA образовывался при молярном соотношении 1,2:1, и указанный комплекс очищали от несвязавшихся Fab с помощью гель-фильтрации в 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8. Кристаллы выращивали с помощью метода диффузии пара в варианте с сидячей каплей при 20°C путем смешивания 0,2 мкл образца концентрированного белка (22 мг/мл) с 0,2 мкл маточной жидкости (0,2 M натрий виннокислый двухводный, 30% PEG MME 550). Кристаллы подвергали мгновенному охлаждению в жидком азоте и собирали дифракционные данные с разрешением до 3,6 Å на канале синхротронного излучения IMCA-CAT 17-ID в Advanced Photon Source. Массив данных обрабатывали в пространственной группе симметрии P6₅ с применением XDS и структуру определяли с помощью молекулярного замещения с использованием Phaser с применением константного домена Fab из PDB ID 4NM4, CDR-усеченного переменного домена Fab из PDB ID 1HEZ и домена α3 MICA из PDB ID 1HYR. Домен α1-α2 MICA не можно было обнаружить с помощью молекулярного замещения. Одна копия комплекса α3 MICA:FabMICA.36 была обнаружена в асимметричной единице и была уточнена с применением Phenix и построена с применением COOT.

[0620] Структурный анализ:

[0621] Доступную для растворителя площадь поверхности на MICA, скрытую после связывания с Fab, рассчитывали с применением AREAIMOL с радиусом исследования 1,4Å. Остатки MICA, скрытые после связывания MICA.36, были следующими: T222, T224, R226,

W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269 (фигуры 22А-22С).

Пример 20. Сравнительные исследования по связыванию с МІСА.

[0622] МІСА.2 сравнивали с антителами к МІСА Ab2 (СМ24002 Ab2) и Ab29 (СМ33322 Ab29), которые раскрыты в публикации международной заявки на выдачу патента WO2013/049517, а также Ab28 (СМ33322 Ab28), которое раскрыто в публикации международной заявки на выдачу патента WO2015085210, в отношении связывания с клетками, экспрессирующими МІСА.

[0623] Экспрессия антител Ab2, Ab28 и Ab29 в клетках СНО также обеспечивалась с помощью рекомбинантных способов (МІСА.5, МІСА.7 и МІСА.6 соответственно). Клетки СНО, трансдуцированные аллельными вариантами МІСА 002, 004, 008, 009, 010, высевали в концентрации 100000 клеток/лунка. Клетки инкубировали с очищенными антителами к МІСА/В в течение 30 минут. Связывание антител с клетками выявляли с применением вторичного антитела к F(ab')₂ человека, конъюгированного с флуорофором. Анализы с использованием проточной цитометрии проводили с применением цитометра FACSCantoII. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции связывания антител с клетками определяли с применением программного обеспечения для анализа FlowJo. Для МІСА.2 было показано значимо более сильное связывание со всеми клеточными линиями СНО, экспрессирующими различные аллельные варианты МІСА, чем для МІСА.5, МІСА.7 и МІСА.6 (фигуры 23А и 23В).

[0624] Антитела также тестировали в отношении связывания с клетками RPMI-8226 человека. Клетки высевали в концентрации 100000 клеток/лунка и инкубировали с антителами к МІСА/В в течение 30 минут. Связывание антител выявляли с применением вторичного антитела к F(ab')₂ человека, конъюгированного с флуорофором. Анализы с использованием проточной цитометрии проводили с применением цитометра FACSCantoII. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции связывания антител с клетками определяли с применением программного обеспечения для анализа FlowJo. Для МІСА.1 и МІСА.2 было показано значимо более сильное связывание с клетками RPMI-8226, чем для Ab2, Ab28 и Ab29, и супернатантами («супер.») клеточных линий СНО, экспрессирующих их рекомбинантные аналоги МІСА.5, МІСА.7 и МІСА.6 (фигуры 24А и 24В).

Пример 21. Измерение sМІСА в сыворотке крови.

[0625] Трансгенным мышам В6-МІСА путем подкожной (SubQ) инъекции вводили 100 мкл клеток EG7-МІСА в концентрации 5e7 клеток/мл (5e6 клеток/мышь). День имплантации опухоли был отмечен как день 0. В день 5 животным делали

внутрибрюшинную (IP) инъекцию указанным антителом в дозе объемом 10 мл/кг. Образцы сыворотки крови собирали в день 8 и 12 (через 72 и 168 часов после введения дозы антитела) для измерения sMICA.

[0626] Для измерения общего растворимого MICA (sMICA) в сыворотке крови мыши EG7-MICA применяли соответствующий требованиям анализ связывания лиганда на платформе Meso Scale Discovery (MSD). Вкратце, сперва 96-луночный планшет со стрептавидином MSD GOLD покрывали биотинилированным захватывающим антителом к MICA (MICA.1-биотин). Затем планшет инкубировали с образцами и обеспечивали захват sMICA на планшете. Для завершения иммунологического сэндвич-анализа добавляли рутенилированное детектирующее антитело к MICA (MICA.2-Ru). С помощью общего анализа sMICA выявляли как рекомбинантные, так и эндогенные формы MICA в присутствии MICA.36-mIgG2a. Считываемым показателем в анализе была электрохемилюминесценция (ECL). ECL получали после добавления буфера для считывания и считывали планшеты на приборе MSD SECTOR. Полученная в результате ECL является количественным показателем количества sMICA, которое присутствует в образце. Через 72 часа после введения дозы антитела у мышей, которых обрабатывали MICA.36-mIgG2a в концентрации 1 мг/кг и 10 мг/кг, наблюдали повышенное количество sMICA в их сыворотке крови; через 168 часов после введения дозы антитела такое повышение не наблюдали (фиг. 25).

Пример 22. Исследование фармакокинетических показателей (PK) для sMICA.

[0627] Для измерения IV PK, sMICA *009 оценивали в дозах 0,1 и 10 мкг/кг у трансгенных мышей B6-MICA (не несущих опухоль) в присутствии и в отсутствие антитела MICA.36-mIgG2a. Сперва посредством внутрибрюшинного пути (IP) вводили дозу 10 мркг (10 мг/кг) либо антитела MICA.36-mIgG2a, либо изотипического контроля, связывающего KLN. Далее, через 72 ч после введения дозы антитела MICA.36-mIgG2a, в виде болюсной IV-инъекции вводили sMICA*009. Образцы сыворотки крови для PK-анализа собирали через 2 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч, 6 ч, 24 ч, 72 ч, 168 ч и 336 ч после введения мышам дозы sMICA. Для оценки PK-параметров sMICA и антитела MICA.36-mIgG2a применяли некомпартментный PK-анализ. Уровни sMICA у животных, которым вводили дозу 0,1 мкг/кг, были ниже уровня количественного обнаружения (BLQ). $T_{1/2}$ для 10 мкг/кг sMICA при введении отдельно составляет 0,07ч, однако время полужизни sMICA является значимо большим в присутствии MICA.36-mIgG2a (3,5 ч) (фиг. 26), вероятно, из-за большего $T_{1/2}$ комплекса sMICA-mAb, по сравнению с таковым sMICA. PK MICA.36-mIgG2a согласуется с таковой из предыдущих исследований, и на нее не влияет введение дозы sMICA.

[0628] Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления достаточно полно раскрывает общий характер настоящего изобретения, чтобы другие лица могли, с использованием знаний в данной области, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты осуществления без излишнего проведения экспериментов, без отклонения от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, подразумевается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления, основываясь на идеях и рекомендациях, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что используемые в настоящем документе формулировки или терминология приведены в целях описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки настоящего описания должны толковаться специалистом в данной области в свете идей и рекомендаций по настоящему изобретению.

[0629] Другие варианты осуществления настоящего изобретения будут понятны специалистам в данной области при рассмотрении настоящего описания и осуществлении на практике раскрытого в настоящем документе изобретения. Подразумевается, что настоящее описание и примеры будут рассматриваться исключительно как иллюстративные, причем истинные объем и сущность настоящего изобретения определены нижеследующей формулой изобретения.

[0630] Все публикации, патенты и заявки на патенты, раскрытые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

[0631] По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительным заявкам на выдачу патента США №№ 62/647556, поданной 23 марта 2018 года, и 62/667170, поданной 4 мая 2018 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с последовательностью А, относящейся к полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или последовательностью В, относящейся к полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL); причем VH содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, VH-CDR2 и VH-CDR3 и VL содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; причем VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37 и 47.

2. Антитело по п. 1, где VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36 и 46.

3. Антитело по п. 1 или п. 2, где VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35 и 45.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, где VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38 и 48.

5. Антитело по любому из пп. 1-4, где VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39 и 49.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, где VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40 и 50.

7. Антитело по любому из пп. 1-6, где

(a) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10;

(b) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20;

(c) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30;

(d) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:36, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40; или

(e) VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45, VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48, VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50.

8. Антитело по любому из пп. 1-7, где антитело обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующего:

- (a) антитело ингибирует сбрасывание MICA опухолевой клеткой;
- (b) антитело повышает мембраносвязанный MICA на поверхности опухолевой клетки;
- (c) антитело снижает уровень растворимого MICA в сыворотке крови у пациента;

- (d) антитело опосредует усиленные ADCC и/или ADCP;
- (e) антитело опосредует усиленное процессирование и/или перекрестное представление антигена клеткой;
- (f) антитело ингибирует рост опухоли и/или метастазирования;
- (g) антитело уменьшает объема опухоли;
- (h) антитело повышает выживаемость без прогрессирования;
- (i) антитело повышает общей выживаемости; и
- (j) любой комбинации указанного.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, где VH содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42.

10. Антитело по любому из пп. 1-9, где VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32 и 42.

11. Антитело по любому из пп. 1-10, где VL содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44.

12. Антитело по любому из пп. 1-11, где VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34 и 44.

13. Антитело по любому из пп. 1-12, где

(a) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4;

(b) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14;

(c) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24;

(d) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34; или

(e) VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44.

14. Антитело по любому из пп. 1-13, где:

(a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60;

(b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60;

(c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64;

(d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68; или

(e) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72.

15. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий один или несколько аминокислотных остатков MICA человека, выбранных из группы, состоящей из G254, D255, L257, Y264, W267 и любой их комбинации, соответствующих SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

16. Антитело по любому из пп. 1-15, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий G254, D255, L257, Y264 и W267, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

17. Антитело по любому из пп. 1-16, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки W150-M163, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

18. Антитело по любому из пп. 1-17, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки Y231-T238, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

19. Антитело по любому из пп. 1-18, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий аминокислотные остатки D255-Q265, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

20. Антитело по п. 19, где эпитоп содержит аминокислотные остатки W253-W267, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

21. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

22. Антитело по любому из пп. 1-14 и п. 21, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

23. Антитело по любому из пп. 1-14, п. 21 и п. 22, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий L201-N220 и T238-Q252, соответствующие SEQ ID NO: 51, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

24. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий R240, Q241, D242, V244 и R279, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

25. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий P258, G260, G262 и Y264, соответствующие SEQ ID NO:51, как определено с помощью метода дисплея на поверхности дрожжевых клеток.

26. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере один остаток, выбранный из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

27. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере два остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

28. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий по меньшей мере три остатка, выбранных из T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

29. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело связывает эпитоп на MICA человека, содержащий T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 и A269, как определено с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов.

30. Антитело по любому из пп. 1-29, где антитело специфически связывает MICA человека с K_D приблизительно 1×10^{-4} М или меньше, причем K_D измерено с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

31. Антитело по любому из пп. 1-30, где антитело специфически связывает МІСА человека со скоростью ассоциации (k_{on}) приблизительно 1×10^{-4} М 1/Мс или более, причем скорость ассоциации k_{on} измерена с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

32. Антитело по любому из пп. 1-31, где антитело специфически связывает МІСА человека со скоростью диссоциации (k_{off}) приблизительно 1×10^{-4} М 1/с или меньше, причем k_{off} измерена с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

33. Антитело по любому из пп. 1-32, где антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианта.

34. Антитело по любому из пп. 1-33, где антитело представляет собой IgG1-антитело.

35. Антитело по любому из пп. 1-34, которое является нефукозилированным.

36. Антитело по любому из пп. 1-35, где антитело содержит константную область в тяжелой цепи, и причем константная область содержит мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO: 58.

37. Антитело по любому из пп. 1-36, где антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

38. Антитело, которое специфически связывается с белком А, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или белком В, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL); причем VH содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, VH-CDR2 и VH-CDR3 и VL содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; причем

VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5,

VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6,

VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7,

VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8,

VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и

VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10; и

причем антитело является нефукозилированным.

39. Антитело по п. 38, где VH содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, и VL содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4.

40. Антитело по п. 39, где антитело содержит константную область в тяжелой цепи, которая содержит мутацию с заменой G на A в положении, которое соответствует остатку 234 в SEQ ID NO: 58.

41. Антитело по любому из пп. 38-40, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60.

42. Антитело по любому из пп. 38 или п. 39, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:130, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60.

43. Антитело по п. 41 или п. 42, где антитело является нефукозилированным.

44. Антитело по п. 41 или п. 42, где антитело является гипофукозилированным.

45. Антитело, которое специфически связывается с белком А, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICA), и/или белком В, родственным полипептиду I класса МНС человека (MICB), содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60, причем антитело является нефукозилированным.

46. Антитело по любому из пп. 43-45, которое продуцировано клеточной линией, у которой уровень экспрессии фукозилтрансферазы понижен, или указанная экспрессия устранена.

47. Антитело по любому из пп. 43-45, которое продуцировано клеточной линией, у которой отсутствует ген FUT8 или которая имеет функционально нарушенный ген FUT8 (кодирующий α -(1,6)-фукозилтрансферазу).

48. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующие антитело по любому из пп. 1-47.

49. Вектор или набор векторов, содержащие полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 48.

50. Клетка-хозяин, содержащая антитело по любому из пп. 1-47, полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 48 или вектор или набор векторов по п. 49.

51. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп. 1-47 и терапевтическое средство.

52. Иммуноконъюгат по п. 51, где терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из цитотоксина, лекарственного средства, не являющегося цитотоксическим, радиоактивного вещества, второго антитела, фермента, антинеопластического средства и любой их комбинации.

53. Иммуноконъюгат по п. 52, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из доластатина, монометилауристатина Е (ММАЕ), майтанзина, дуокармицина, калихеамицина, пирролобензодиазепина, дуокармицина, центанамицина, SN38, доксорубицина, их производного, их синтетического аналога и любой их комбинации.

54. Иммуноконъюгат по п. 53, где цитотоксин содержит цитотоксин А.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-47, полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 48, вектор или набор векторов по п. 49 или иммуноконъюгат по любому из пп. 51-54 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

56. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-47 и второе антитело.

57. Фармацевтическая композиция по п. 56, где второе антитело специфически связывает белок, выбранный из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGF β , IL-10, IL-8, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CD27, GITR и любой их комбинации.

58. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело содержит антитело к PD-1.

59. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 56-58, где второе антитело включает ниволумаб или пембролизумаб.

60. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к PD-L1.

61. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к CTLA-4.

62. Фармацевтическая композиция по п. 61, где антитело к CTLA-4 включает тремелимуаб или ипилимумаб.

63. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к LAG3.

64. Фармацевтическая композиция по п. 63, где антитело к LAG3 включает 25F7.

65. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к CD137.

66. Фармацевтическая композиция по п. 65, где антитело к CD137 включает урелумаб.

67. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к KIR.

68. Фармацевтическая композиция по п. 57, где антитело к KIR включает лирилумаб.

69. Фармацевтическая композиция по п. 56 или п. 57, где второе антитело включает антитело к GITR.

70. Фармацевтическая композиция по п. 69, где антитело к GITR включает MK4166 или TRX518.

71. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 55-70, которая составлена для внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, интратекального, внутрилимфатического, внутриочагового, интракапсулярного, интраорбитального, внутрисердечного, внутрикожного, транстрахеального, подкожного, субкутикулярного, внутрисуставного, субкапсулярного, субарахноидального, интраспинального, эпидурального, интрастерального, местного, эпидермального или мукозального введения.

72. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-47, полинуклеотида или набора полинуклеотидов по п. 48, вектора или набора векторов по п. 49, клетки-хозяина по п. 50, иммуноконъюгата по любому из пп. 51-54 или фармацевтической композиции по любому из пп. 55-71.

73. Способ по п. 72, в котором рак включает опухоль.

74. Способ по п. 72 или п. 73, в котором рак выбран из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого (SCLC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, глиомы, рака желудочно-кишечного тракта, рака почки, светлоклеточной карциномы, рака яичника, рака печени, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, злокачественной опухоли почки, почечно-

клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, гормонально-рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака щитовидной железы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, глиобластомы (мультиформной глиобластомы), рака шейки матки, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы (гепатоцеллюлярной карциномы), рака молочной железы, карциномы толстой кишки, рака (или карциномы) головы и шеи, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), злокачественной опухоли желудка, герминогенной опухоли, детской саркомы, лимфомы синоназального типа из естественных клеток-киллеров, меланомы, метастатической злокачественной меланомы, злокачественной кожной или интраокулярной меланомы, мезотелиомы, рака кости, рака кожи, рака матки, рака анальной области, тестикулярного рака, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, рака пищевода, рака тонкого кишечника, рака эндокринной системы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягкой ткани, рака уретры, рака полового члена, солидных опухолей у детей, рака мочеточника, карциномы почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли позвоночника, злокачественной опухоли головного мозга, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, форм рака, индуцированных факторами окружающей среды, включая таковые, индуцированные асбестом, связанных с вирусами форм рака или форм рака, возникающих вследствие инфицирования вирусами, опухолей, связанных с вирусом папилломы человека (HPV) или возникающих вследствие инфицирования указанным, и комбинаций указанных форм рака.

75. Способ по п. 72 или п. 73, в котором рак выбран из острого лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и хронического миелоидного лейкоза (CML), недифференцированного AML, миелобластного лейкоза, миелобластного лейкоза, промиелоцитарного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, моноцитарного лейкоза, эритролейкоза, мегакариобластного лейкоза, изолированной гранулоцитарной саркомы, хлоромы, лимфомы Ходжкина (HL), неходжкинской лимфомы (NHL), В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, лимфоплазмочитарной лимфомы, моноцитоидной В-клеточной лимфомы, лимфомы из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластической крупноклеточной лимфомы, Т-клеточных лимфомы/лейкоза у взрослых, лимфомы из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, ангиоцентрической лимфомы, кишечной Т-клеточной лимфомы, первичной

медиастинальной В-клеточной лимфомы, Т-лимфобластной лимфомы из клеток-предшественников, Т-лимфобластной; периферической Т-клеточной лимфомы, лимфобластной лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, истинной гистиоцитарной лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной выпотной лимфомы, лимфобластной лимфомы (LBL), опухолей кроветворной ткани из клеток лимфоидного ряда, острого лимфобластного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, фолликулярной лимфомы, диффузной гистиоцитарной лимфомы (DHL), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластной лимфомы из клеток-предшественников, кожной Т-клеточной лимфомы (CTLC), лимфоплазмочитарной лимфомы (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, IgG-миеломы, миеломы Бенс-Джонса, несекретирующей миеломы, тлеющей миеломы (вялотекущей миеломы), изолированной плазмочитомы, множественной миеломы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), волосатоклеточной лимфомы; и любых комбинаций указанных форм рака.

76. Способ по любому из пп. 72-75, в котором рак выбран из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), меланомы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, злокачественной опухоли желудка, рака толстой кишки, почечно-клеточной карциномы (RCC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), мезотелиомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака предстательной железы, множественной миеломы и комбинаций указанных форм рака.

77. Способ по любому из пп. 72-76, в котором рак выбран из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), меланомы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, злокачественной опухоли желудка, рака толстой кишки и комбинаций указанных форм рака.

78. Способ ингибирования сбрасывания МІСА опухолевой клеткой у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-47, полинуклеотида или набора полинуклеотидов по п. 48, вектора или набора векторов по п. 49, клетки-хозяина по п. 50, иммуноконъюгата по любому из пп. 51-54 или фармацевтической композиции по любому из пп. 55-71.

79. Способ снижения уровня сбрасываемого МІСА в сыворотке крови и/или сохранения МІСА на поверхности опухолевых клеток у нуждающегося в этом субъекта,

предусматривающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-47, полинуклеотида или набора полинуклеотидов по п. 48, вектора или набора векторов по п. 49, клетки-хозяина по п. 50, иммуноконъюгата по любому из пп. 51-54 или фармацевтической композиции по любому из пп. 55-71.

80. Способ уничтожения опухолевой клетки у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение антитела по любому из пп. 1-47, полинуклеотида или набора полинуклеотидов по п. 48, вектора или набора векторов по п. 49, клетки-хозяина по п. 50, иммуноконъюгата по любому из пп. 51-54 или фармацевтической композиции по любому из пп. 55-71.

81. Способ по любому из пп. 78-80, в котором у субъекта наблюдается рак, выбранный из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), меланомы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, злокачественной опухоли желудка, рака толстой кишки, почечно-клеточной карциномы (RCC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), мезотелиомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака предстательной железы, множественной миеломы и комбинаций указанных форм рака.

82. Способ по любому из пп. 67-72, в котором антитело, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, вектор или набор векторов, клетку-хозяина, иммуноконъюгат или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, внутривентриально, внутримышечно, внутриаартериально, интратекально, внутрелимфатически, внутриочагово, интракапсулярно, интраорбитально, внутрисердечно, внутрикожно, транстрахеально, подкожно, субкутикулярно, внутрисуставно, субкапсулярно, субарахноидально, интраспинально, эпидурально, интратерально, местно, эпидермально или мукозально.

83. Способ по любому из пп. 72-82, в котором субъектом является человек.

84. Способ по любому из пп. 72-83, дополнительно предусматривающий применение у субъекта второго средства терапии.

85. Способ по п. 84, в котором второе средство терапии содержит эффективное количество антитела, которое специфически связывает белок, выбранный из индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A,

CD27, CD96, глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка (GITR) и медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM), белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганда 1 белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1), CTLA-4, В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного белка 3, содержащего иммуноглобулиновый и муциновый домен (TIM-3), белка, кодируемого геном 3 активации лимфоцитов (LAG-3), рецептора A2a аденозина (A2aR), лектин-подобного рецептора G1 клеток-киллеров (KLRG-1), рецептора 2B4 естественных клеток-киллеров (CD244), CD160, Т-клеточного иммунорецептора с Ig- и ITIM-доменами (TIGIT) и рецептора супрессора активации Т-клеток, содержащего IgV-домен (VISTA), KIR, TGF β , IL-10, IL-8, B7-H4, лиганда Fas, CXCR4, мезотелина, CEACAM-1, CD52, HER2 и любой их комбинации.

86. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к PD-1.

87. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает ниволумаб или пембролизумаб.

88. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к PD-L1.

89. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к PD-L1, выбранное из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба.

90. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к CTLA-4.

91. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает тремелимуаб или ипилимумаб.

92. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к LAG3.

93. Способ по п. 92, в котором антитело к LAG3 включает 25F7.

94. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к CD137.

95. Способ по п. 84 или п. 85, в котором антитело к CD137 включает урелумаб.

96. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к KIR.

97. Способ по п. 84 или п. 85, в котором антитело к KIR включает лирилумаб.

98. Способ по п. 84 или п. 85, в котором второе терапевтическое средство включает антитело к GITR.

99. Способ по п. 98, в котором антитело к GITR включает MK4166 или TRX518.

100. Способ по п. 84, в котором второе средство терапии содержит химиотерапевтическое средство от рака, облучение, средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, и/или средство, которое повышает выживаемость NK- и/или CD8⁺ T-клеток.

101. Способ по п. 100, в котором второе средство терапии содержит химиотерапевтическое средство, которое индуцирует экспрессию MICA/B на поверхности опухолевых клеток.

102. Способ по п. 100 или п. 101, в котором второе средство терапии содержит химиотерапевтическое средство, выбранное из ингибиторов протеасом, IMiD и ингибиторов Vet.

103. Способ по п. 102, в котором ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб.

104. Способ по п. 100, в котором второе средство терапии содержит пегилированный IL-10 и слитую молекулу IL-10-Fc.

105. Способ по п. 100, в котором второе средство терапии содержит средство, которое повышает выживаемость NK- и/или CD8+ Т-клеток, выбранное из пегилированного IL-2.

106. Способ по п. 84, в котором второе средство терапии содержит средство, выбранное из доксорубина (ADRIAMYCIN®), цисплатина, карбоплатина, блеомицина сульфата, кармустина, хлорамбуцила (LEUKERAN®), циклофосфида (CYTOXAN®; NEOSAR®), леналидомида (REVLIMID®), бортезомиба (VELCADE®), дексаметазона, митоксантрона, этопозиды, цитарабина, бендамустина (TREANDA®), ритуксимаба (RITUXAN®), ифосфида, винкристина (ONCOVIN®), флударабина (FLUDARA®), талидомида (THALOMID®), алемтузумаба (CAMPATH®, офатумумаба (ARZERRA®), эверолимуса (AFINITOR®, ZORTRESS®) и карфилзомиба (KYPROLISTM).

107. Способ по п. 84, в котором второе средство терапии содержит антагонист IDO.

108. Способ получения антитела, включающий экспрессию полинуклеотида или набора полинуклеотидов по п. 48 или вектора или набора векторов по п. 49 в клетке-хозяине в подходящих условиях.

109. Способ по п. 108, дополнительно предусматривающий сбор антитела.

```

      Q V Q   L V E S   G G G   V V Q   P G R S
1    CAGGTGCAAC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC
                                     CDR1
      L R L   S C A   A S G F   T F S   N Y A
51   CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CGTCTGGATT CACCTTCAGT AACTATGCCA
      M H W V   R Q A   P G E   G L E W   V A L
101  TGCACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGCGAGG GGCTGGAATG GGTGGCACTT
                                     CDR2
      I W Y   D G S N   K F Y   G D S   V K G R
151  ATATGGTATG ATGGAAGTAA TAAATTCTAT GGAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I   S R D   N S K N   T L Y   L Q M
201  CTTCAACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA
      N S L S   A E D   T A V   Y Y C A   R E G
251  ACAGCCTGAG CGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGGGA
      S G H   Y W G Q   G T L   V T V   S S
301  AGTGGGCACT ACTGGGGCCA GGGAACCCTG GTCACCGTCT CCTCA

```

1/85

Фиг. 1А – VH1 19G6-MICA.36

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	RF	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕГМЕНТ	VH3	3-33	pH3v4D		DP-50/hv3019b9...+
D-СЕГМЕНТ	НЕ ОПРЕДЕЛЕНО				.
J-СЕГМЕНТ	JH4	4			JH4b
ВХОДНАЯ	19G6.D5.E4-VH1				

3-33	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR1																						
3-33	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-

	CDR2																						
3-33	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
ВХОДНАЯ	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-

3-33	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-

	CDR3																											
3-33	V	Y	Y	C	A	R																						
JH4													Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S				
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	E	G	S	G	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

2/85

Фиг. 1В – VH1 19G6-MICA.36

```

      A I Q   L T Q S   P S S   L S A   S V G D
1    GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA
                                   CDR1
      R V T   I T C   R A S Q   G I S   S A L
51   CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATCAGC AGTGCTTTAG

      A W Y Q   Q K P   G K V   P K S L   I Y D
101  CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGTTC CTAAGTCCCT GATCTATGAT
      CDR2
      A S S   L E S G   V P S   R F S   G S G S
151  GCCTCCAGTT TGGAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC

      G T D   F T L   T I S S   L Q P   E D F
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG
                                   CDR3
      A T Y Y   C Q Q   F N S   Y P I T   F G Q
251  CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC CTTCGGCCAA

      G T R   L E I K
301  GGGACACGAC TGGAGATTAA A

```

3/85

Фиг. 1С – VK1 19G6-MICA.36

	СЕМЕЙСТВО					ЛОКУС					TGL		ЗАПИСЬ В V BASE											
V-СЕГМЕНТ	VK1					L18							Va' '+											
J-СЕГМЕНТ	JK5					5							JK5											
ВХОДНАЯ	19G6.D5.E4-VK1																							
L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR1																								
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S	
CDR2																								
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR3																								
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N	
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	N Y																							
JK5	I T F G Q G T R L E I K																							
ВХОДНАЯ	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Фиг. 1D – VK1 19G6-MICA.36

```

      M E F   G L S W   V F L   V A L   L R G V
1   ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT

      Q C Q   V Q L   V E S G   G D V   V Q P
51  CCAGTGTGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGACGTG GTCCAGCCTG

      G R S L   R L S   C A A   S G F T   F S N
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAAC
      CDR1
      Y N I   H W V R   Q A P   G K G   L E W V
151 TATAACATAC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
      CDR2
      A V I   R Y D   G I N K   Y Y A   D S V
201 GGCAGTTATA AGGTATGATG GAATTAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA

      K G R F   I I S   R D N   S K N T   L Y L
251 AGGGCCGATT CATCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG

      Q M N   S L R A   E D T   A V Y   Y C A S
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
      CDR3
      G P P   D A F   N I W G   Q G T M   V T
351 CGGGCCCCCT GATGCTTTTA ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG

      V S S
401 TCTCTTCA

```

5/85

Фиг. 2А – VH1 16A5-MICA.52

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	RF	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕГМЕНТ	VH3	3-33		pH3v4D	DP-50/hv3019b9...+
D-СЕГМЕНТ	НЕ ОПРЕДЕЛЕНО				.
J-СЕГМЕНТ	JH3	3			JH3b
ВХОДНАЯ	16A5.C1.G2-VH1				

3-33	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-33	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	CDR1													
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-33	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	R	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I

3-33	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-33	V	Y	Y	C	A	R	CDR3																
JH3																							
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	S	G	P	P	-	A	F	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JH3	S	S
ВХОДНАЯ	-	-

6/85

Фиг. 2В – VH1 16A5-MICA.52

```

      M R V   P A Q L   L G L   L L L   W L P G
1   ATGAGGGTCC CCGCTCAGCT CCTGGGGGCTT CTGCTGCTCT GGCTCCCAGG

      A R C   A I Q   L T Q S   P S S   L S A
51  TGCCAGATGT GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT
                                CDR1
      S V G D   R V T   I T C   R A S Q   G I S
101 CTGTAGGAGA CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATCAGC

      S A L   A W Y Q   Q K P   G K V   P K S L
151 AGTGCTTTAG CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGTTC CTAAGTCCCT
                                CDR2
      I Y D   A S S   L E S G   V P S   R F S
201 GATCTATGAT GCCTCCAGTT TGGAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG

      G S G S   G T D   F T L   T I S S   L Q P
251 GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT
                                CDR3
      E D F   A T Y Y   C Q Q   F N S   Y P I T
301 GAAGATTTTG CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC

      F G Q   G T R   L E I K
351 CTTCGGCCAA GGGACACGAC TGGAGATTAA A

```

7/85

Фиг. 2С – VH1 16A5-MICA.52

	СЕМЕЙСТВО					ЛОКУС					TGL		ЗАПИСЬ В V BASE										
V-СЕГМЕНТ	VK1					L18							Va'''+										
J-СЕГМЕНТ	JK5					5							JK5										
ВХОДНАЯ	16A5.C1.G2-VK1																						
L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR1																							
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S
CDR2																							
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR3																							
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	N Y																						
JK5						I	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K						
ВХОДНАЯ	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							

8/85

Фиг. 2D – VH1 16A5-MICA.52

1	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D
	GCC	ATC	CAG	TTG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC
							<u>CDR1</u>										
52	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	GGC	ATT	AGC	AGT	GCT	TTA	GCC
															<u>CDR2</u>		
103	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A
	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	GCT	CCT	AAG	CTC	CTG	ATC	TAT	GAT	GCC
154	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G
	TCC	AGT	TTG	GAA	AGT	GGG	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGC	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG
205	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T
	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT
				<u>CDR3</u>													
256	Y	Y	C	Q	Q	F	N	S	Y	P	F	T	F	G	P	G	T
	TAT	TAC	TGT	CAA	CAG	TTT	AAT	AGT	TAC	CCA	TTC	ACT	TTC	GGC	CCT	GGG	ACC
307	K	V	D	I	K												
	AAA	GTG	GAT	ATC	AAA												

9/85

Фиг. 2Е – VK2 16A5-MICA.53

	СЕМЕЙСТВО					ЛОКУС					TGL		ЗАПИСЬ В V BASE										
V-СЕРМЕНТ	VK1					L18							Va'''+										
J-СЕРМЕНТ	JK3					3							JK3										
ВХОДНАЯ	16A5.C1.G2-VK2																						
L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR1																							
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR2																							
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR3																							
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	N Y																						
JK3	F T F G P G T K V D I K																						
ВХОДНАЯ	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

10/85

Фиг. 2F – VK2 16A5-MICA.53

```

      M G S   T A I L   A L L   L A V   L Q G V
1   ATGGGGTCAA CCGCCATCCT CGCCCTCCTC CTGGCTGTTC TCCAAGGAGT

      C A E   V Q L   V Q S G   A E V   K K P
51  CTGTGCCGAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCAGAGGTG AAAAAGCCCG

      G E S L   K I S   C K G   S G Y S   F T N
101 GGGAGTCTCT GAAGATCTCC TGTAAGGGTT CTGGATACAG TTTTACCAAC
      CDR1
      Y W I   G W V R   Q M P   G K G   L E W L
151 TACTGGATCG GCTGGGTGCG CCAGATGCCC GGGAAAGGCC TGGAGTGGTT
      CDR2
      G I I   H P G   D S Y T   R Y S   P S F
201 GGGGATCATC CATCCTGGTG ACTCTTATAC CAGATACAGC CCGTCCTTCC

      Q G Q V   T I S   A D K   S I S T   A Y L
251 AAGGCCAGGT CACCATCTCA GCCGACAAGT CCATCAGCAC CGCCTACCTG

      Q W S   S L K A   S D T   A I Y   Y C A R
301 CAGTGGAGCA GCCTGAAGGC CTCGGACACC GCCATATATT ACTGTGCGAG
      CDR3
      E G I   A A T   P F D Y   W G Q   G T L
351 AGAGGGTATA GCAGCAACTC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG

      V T V S   S
401 TCACCGTCTC CTCA

```

11/85

Фиг. 3А – VH1 24G11-MICA.54

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	RF	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕГМЕНТ	VH5	5-51	HC2,pVx6		DP-73/V5-51...+
D-СЕГМЕНТ	D6	6-13	2		D6-13/DN1
J-СЕГМЕНТ	JH4	4			JH4b
ВХОДНАЯ	24G11.A10.E1-VH1				

5-51	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5-51	G	S	G	Y	S	F	T	CDR1	S	Y	W	I	G	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-		N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5-51	W	M	G	CDR2	I	I	Y	P	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T
ВХОДНАЯ	-	L	-		-	-	H	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5-51	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5-51	M	Y	Y	C	A	R	CDR3																
6-13								G	I	A	A												
JH4														F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
ВХОДНАЯ	I	-	-	-	-	-		E	-	-	-	-	T	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JH4	T	V	S	S
ВХОДНАЯ	-	-	-	-

Фиг. 3В – VH1 24G11-MICA.54

```

      M E A   P A Q L   L F L   L L L   W L P D
1   ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA

      T T G   E I V   L T Q S   P A T   L S L
51  TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT
                                     CDR1
      S P G E   R A T   L S C   R A S Q   S V S
101 CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC

      S Y L   A W F Q   Q K P   G Q A   P R L L
151 AGCTACTTAG CCTGGTTCCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT
                                     CDR2
      I Y   D A S N   R A T   G   I P A   R F S
201 CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG

      G S G S   G T D   F T L   T I S S   L E P
251 GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
                                     CDR3
      E D F   A V Y Y   C   Q Q   R S N   W P P T
301 GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCCGAC

      F G Q   G T K   V E I K
351 GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA A

```

13/85

Фиг. 3С – VK1 24G11-MICA.54

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕМЕНТ	VK3	L6		Vg/38K...+
J-СЕМЕНТ	JK1	1		JK1
ВХОДНАЯ	24G11.A10.E1-VK1			

```

      M E L   G L C W   I F L   V A I   L E G V
1   ATGGAGTTGG GGCTGTGCTG GATTTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT

      Q C E   V Q L   V E S G   G G L   V Q P
51  CCAGTGTGAG GTGCAACTGG TGAATCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG

      G G S L   R L S   C A A   S G F T   F S T
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAGTACC
      CDR1
      Y S M   N W V R   Q A P   G K G   L E W V
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
      CDR2
      S Y I   S Y R   S R T I   Y Y A   D S V
201 TTCATACATT AGTTATCGTA GTCGTACCAT ATACTACGCA GACTCTGTGA

      K G R F   T I S   R D N   A R N S   L Y L
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAGGAACTC ACTGTATCTG

      Q M N   S L R D   E D T   A V Y   Y C A R
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
      CDR3
      W G Y   G S G   G F D Y   W G Q   G T L
351 ATGGGGCTAT GGTTCGGGGG GCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG

      V T V S   S
401 TCACCGTCTC CTCA

```

15/85

Фиг. 4А – VH1 3F5-MICA.2

3-48 зародышевой линии	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W	CDR1
VH 3F5	- - - - -	- - - - -
3-48 зародышевой линии	V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R	CDR2
VH 3F5	- - - - -	- - - - -
3-48 зародышевой линии	D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R	CDR3
JH4b зародышевой линии	- - - R - - - - -	- - - - -
VH 3F5	- - - R - - - - -	- - - - -
JH4b зародышевой линии	W G Q G T L V T V S S	
VH 3F5	- - - - -	

Фиг. 4B – VH1 3F5-MICA.2

```

      M E T P A Q L L F L L L L W L P D
1  ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA

      T T G E I V L T Q S P G T L S L
51 TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT
                                CDR1
      S P G E R A T L S C R A S Q S V S
101 CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC

      S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L
151 AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT
                                CDR2
      L I Y G A S S R A T G I P D R F
201 CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA

      S G S G S G T D F T L T I S R L E
251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG
                                CDR3
      P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S F T
301 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTCAG CAGTATGGTA GCTCATTCAC

      F G P G T K V D I K
351 TTTCGGCCCT GGGACCAAAG TGGATATCAA A

```

17/85

Фиг. 4С – VK1 3F5-MICA.2

A27 зародышевой линии VK 3F5	CDR1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
	- - - - -
A27 зародышевой линии VK 3F5	CDR1 S Y L A W Y Q Q K F G Q A F R L L I Y G A S S R A T G I P D R
	- - - - -
A27 зародышевой линии VK 3F5	CDR3 F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G
	- - - - -
A27 зародышевой линии JK3 зародышевой линии VK 3F5	CDR3 S S
	- - - - -
	F T F G P G T K V D I K
	- - - - -

Фиг. 4D – VK1 3F5-MICA.2

```

      M E L G L S W I F L L A I L K G V
1   ATGGAGTTGG GACTGAGCTG GATTTTCCTT TTGGCTATTT TAAAAGGTGT

      Q C E V Q L V E S G G G L V Q P
51  CCAGTGTGAA GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG

      G R S L R L S C A A S G F T F N N
101 GCAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTTAATAAT
      CDR1
      Y A M H W V R Q A P G K G L E W V
151 TATGCCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA GGAAGGGGCC TGGAGTGGGT
      CDR2
      S G I T W N S D S I G Y A D S V
201 CTCAGGTATT ACTTGGAATA GTGATAGCAT AGGCTATGCG GACTCTGTGA
      K G R F T I S R D N A K N S L Y L
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC CCTGTATCTG

      Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K
301 CAAATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACG GCCTTGTATT ACTGTGCAAA
      CDR3
      D S V L L W F G G M D V W G Q G
351 AGATTCCGTA TTACTATGGT TCGGGGGTAT GGACGTCTGG GGCCAAGGGA

      T T V T V S S
401 CCACGGTCAC CGTCTCCTCA

```

19/85

Фиг. 5А – VH1 71C2

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	RF	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕГМЕНТ	VH3	3-09			DP-31/V3-9P...+
D-СЕГМЕНТ	D3	3-10	1		D3-10/DXP'1
J-СЕГМЕНТ	JH6	6			JH6b
ВХОДНАЯ	71C2.D4.C4-VH1				

3-09	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-09	A	S	G	F	T	F	D	<u>CDR1</u>	D	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-09	W	V	S	<u>CDR2</u>	G	I	S	W	N	S	G	S	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-09	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-09	L	Y	Y	C	A	K	D	<u>CDR3</u>															
3-10									V	L	L	W	F	G									
JH6										L	L	L		Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-		W	F	G	-	-	-	-	-	-	-	-

JH6	T	T	V	T	V	S	S
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-

Фиг. 5B – VH1 71C2

	M	E	T	P	A	Q	L	L	F	L	L	L	L	W	L	P	D	
1	ATGGAAACCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA													
	T	T	G	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L		
51	TACCACCGGA	GAAATTGTGT	TGACGCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT													
	CDR1																	
	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	
101	CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTTAGC													
	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	
151	AGCAGCTACT	TAGCCTGGTA	CCAGCAGAAA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT													
	CDR2																	
	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F		
201	CCTCATCTAT	GGTGCATCCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA													
	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	
251	GTGGCAGTGG	GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG													
	CDR3																	
	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	P	P	
301	CCTGAAGATT	TTGCAGTGTA	TTACTGTCAG	CAGTATGGTA	GCTCACCTCC													
	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						
351	GTACACTTTT	GGCCAGGGGA	CCAAGCTGGA	GATCAAA														

21/85

Фиг. 5С – VK1 71С2

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	TGL	ЗАПИСЬ В V BASE
V-СЕГМЕНТ	VK3	A27		DPK22/A27...+
J-СЕГМЕНТ	JK2	2		JK2
ВХОДНАЯ	71C2.D4.C4-VK1			

A27	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR1																						
A27	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

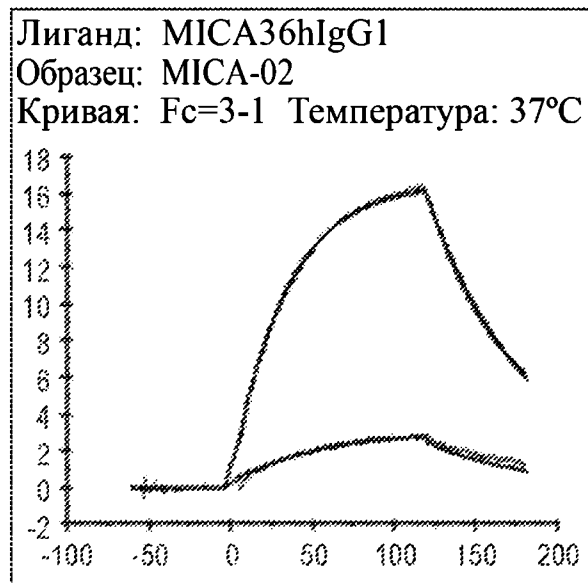
					CDR2																		
A27	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																						CDR3		
A27	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	
ВХОДНАЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

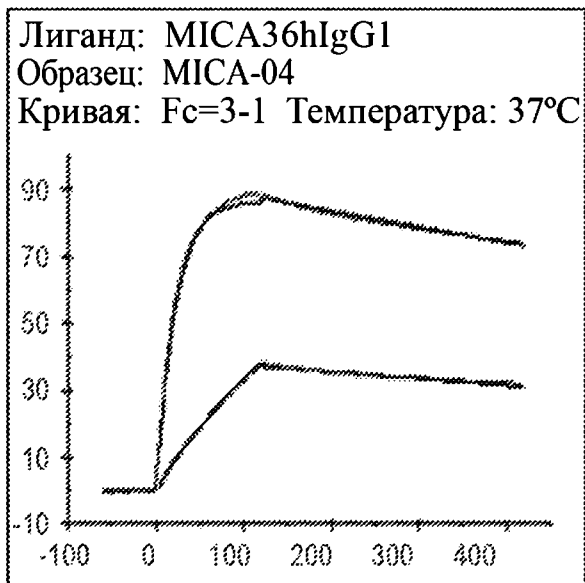
A27	G	S	S																				
JK2					Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K							
ВХОДНАЯ	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							

22/85

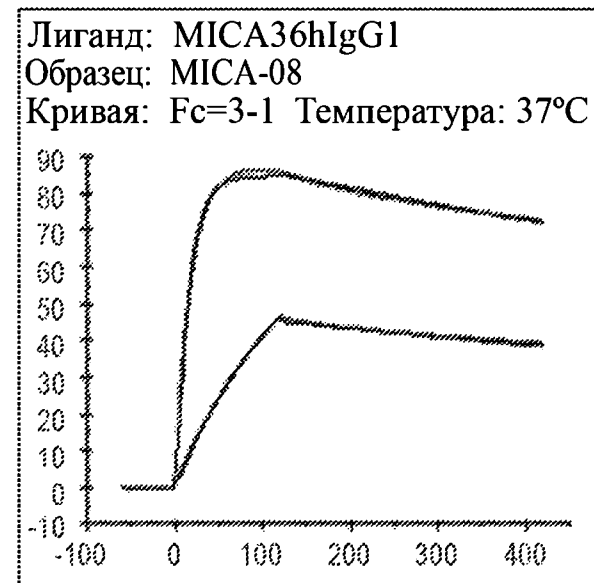
Фиг. 5D – VK1 71C2



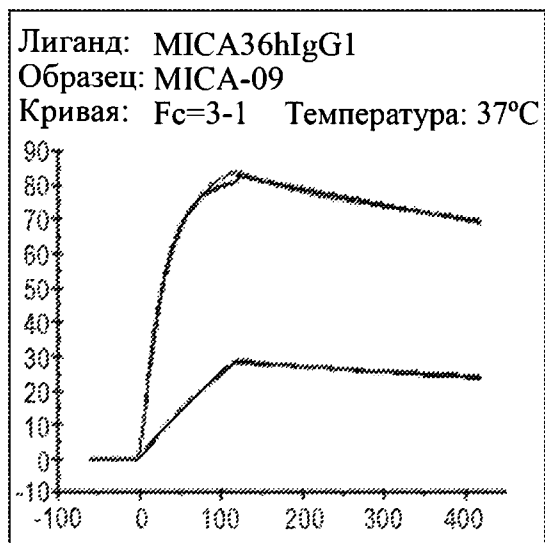
Фиг. 6А



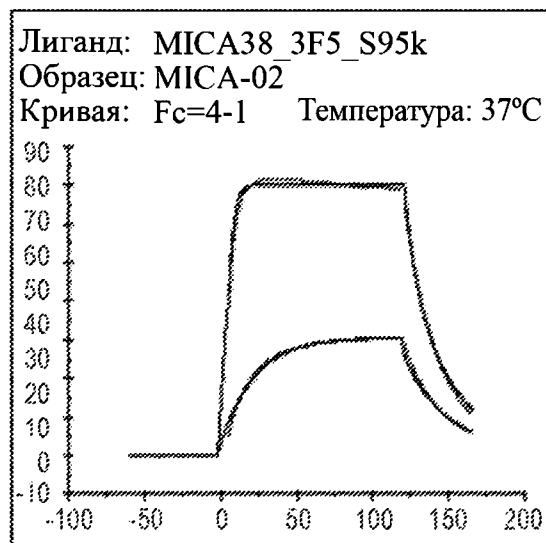
Фиг. 6В



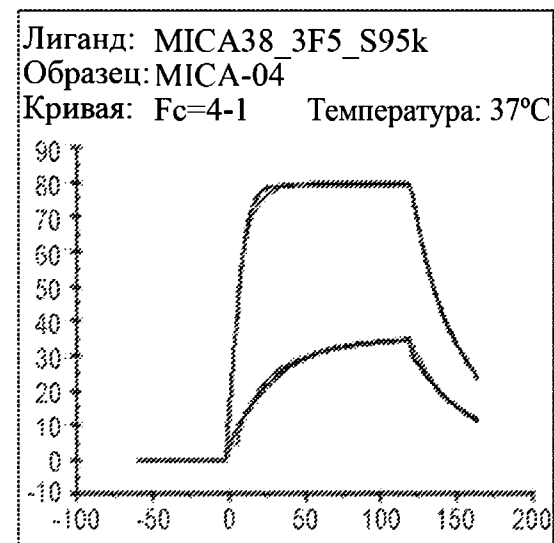
Фиг. 6С



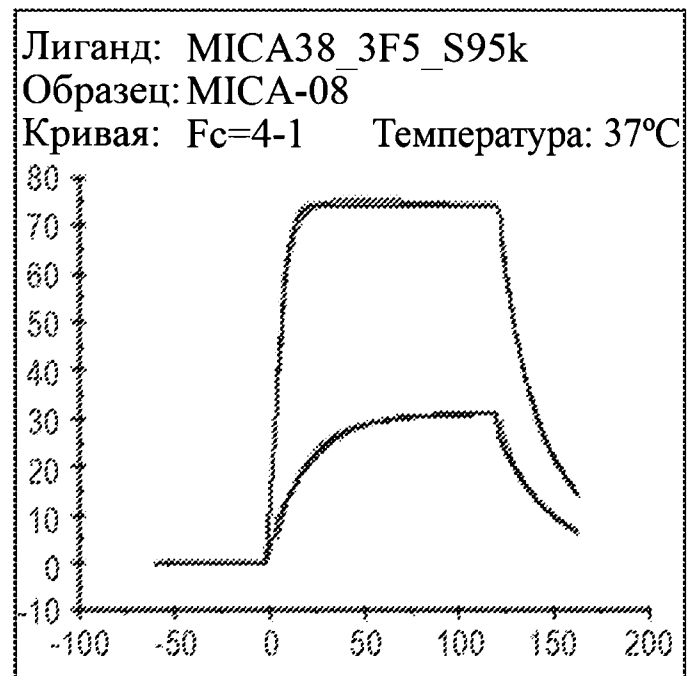
Фиг. 6D



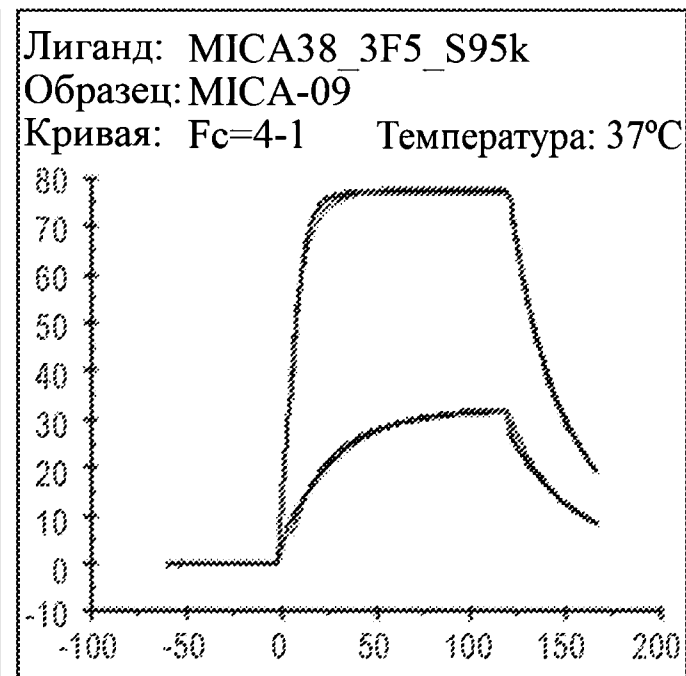
Фиг. 6E



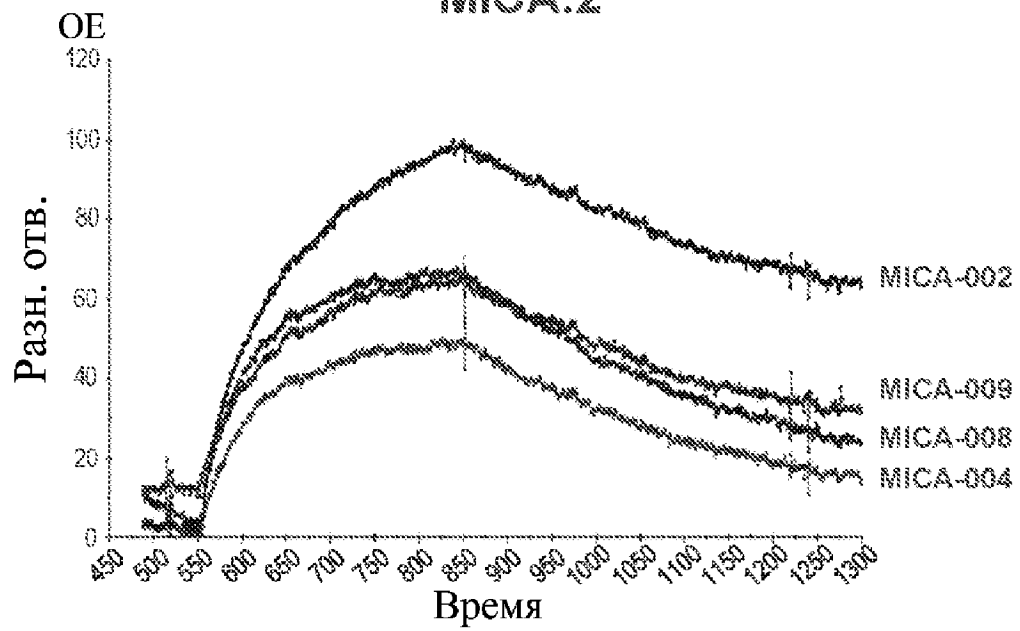
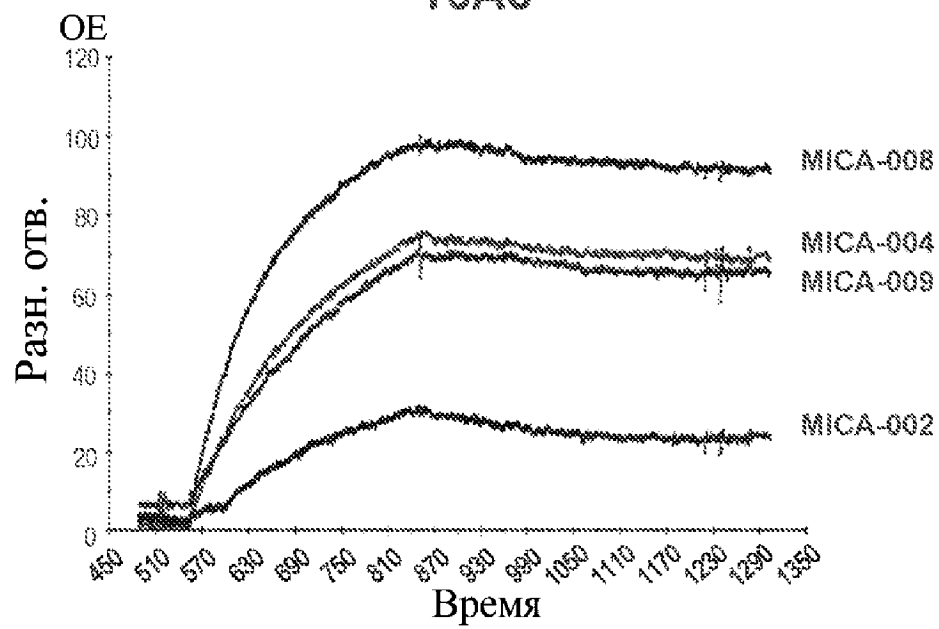
Фиг. 6F

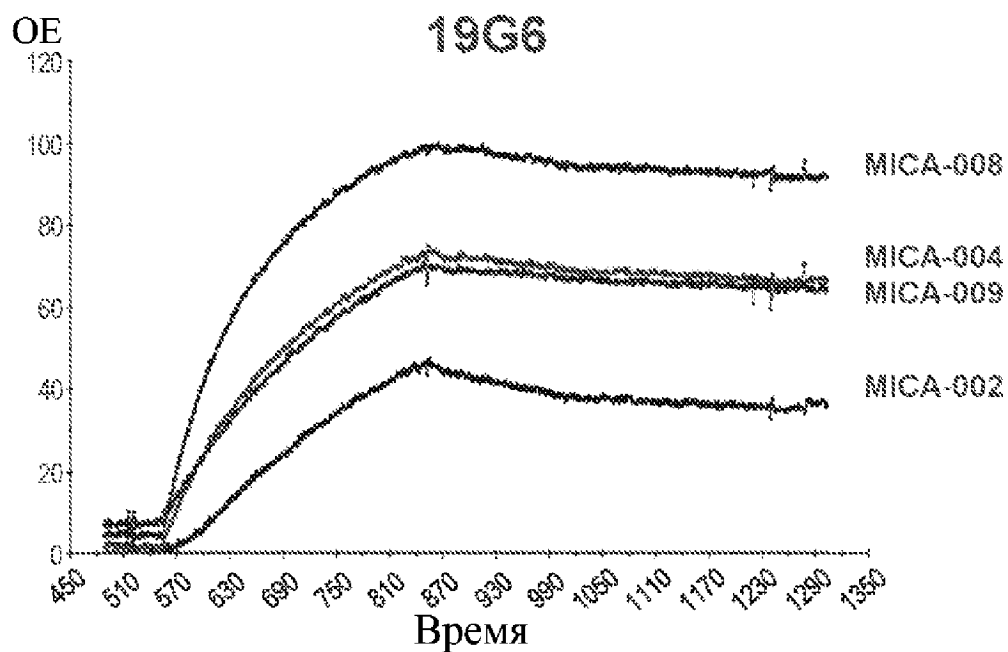
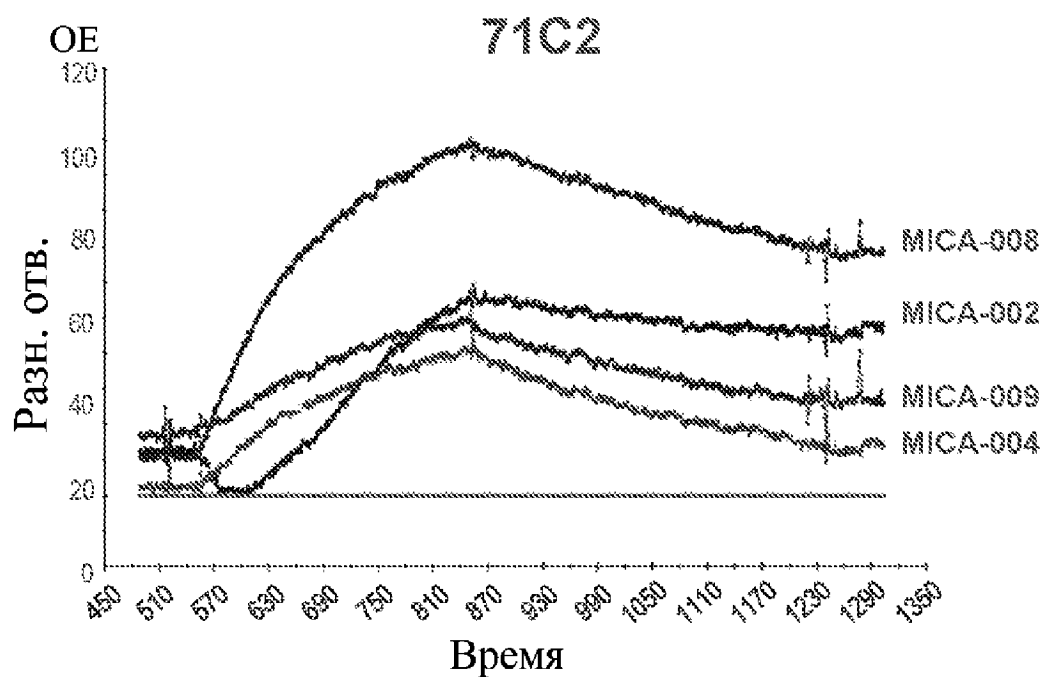


Фиг. 6G

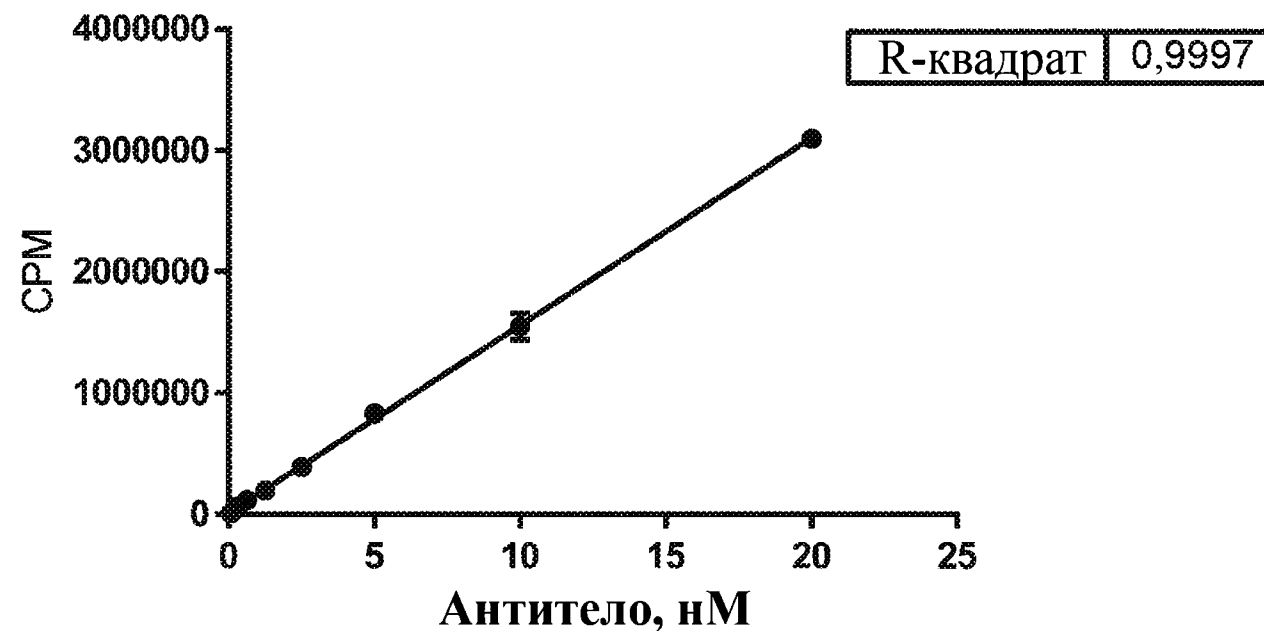


Фиг. 6H

МiCA.2**Фиг. 6I****16A5****Фиг. 6J**

**Фиг. 6К****Фиг. 6Л**

Калибровочная кривая для ^{125}I -MICA.36nf+



Наклон	$154629 \pm 937,5$
Точка пересечения с осью Y	9585 ± 6846

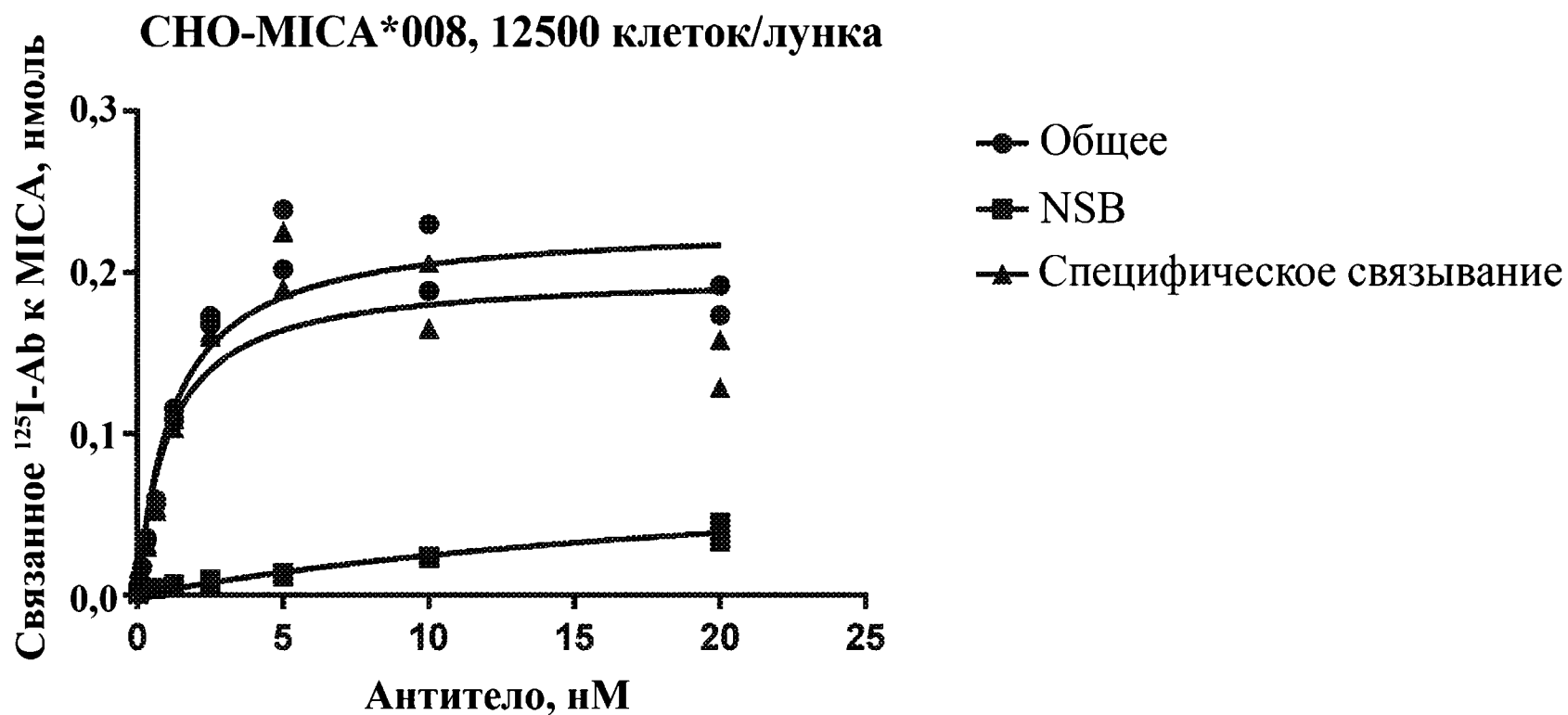
$$y = mX + b$$

$$y = 154629(1\text{нМ}) + 9585$$

$$y = 164214$$

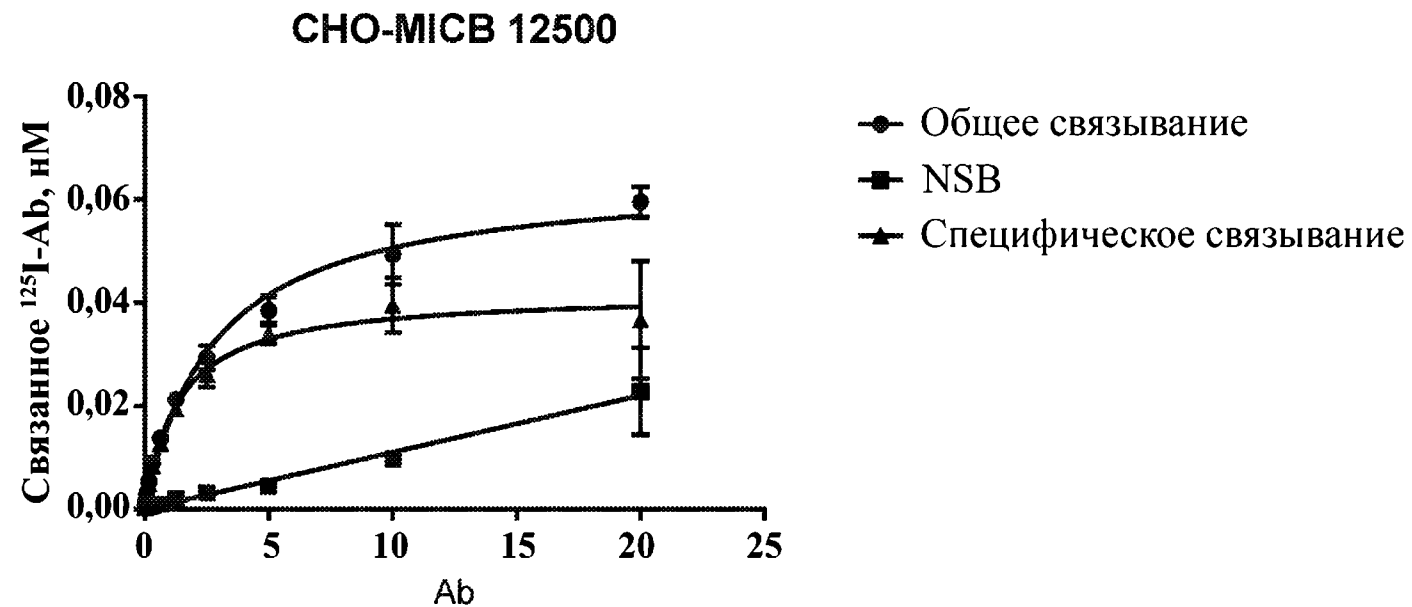
$$1 \text{ нМ Ab} = 164214 \text{ cpm}$$

Фиг. 7А



1,5e6 рецепторов на клетку

Фиг. 7В

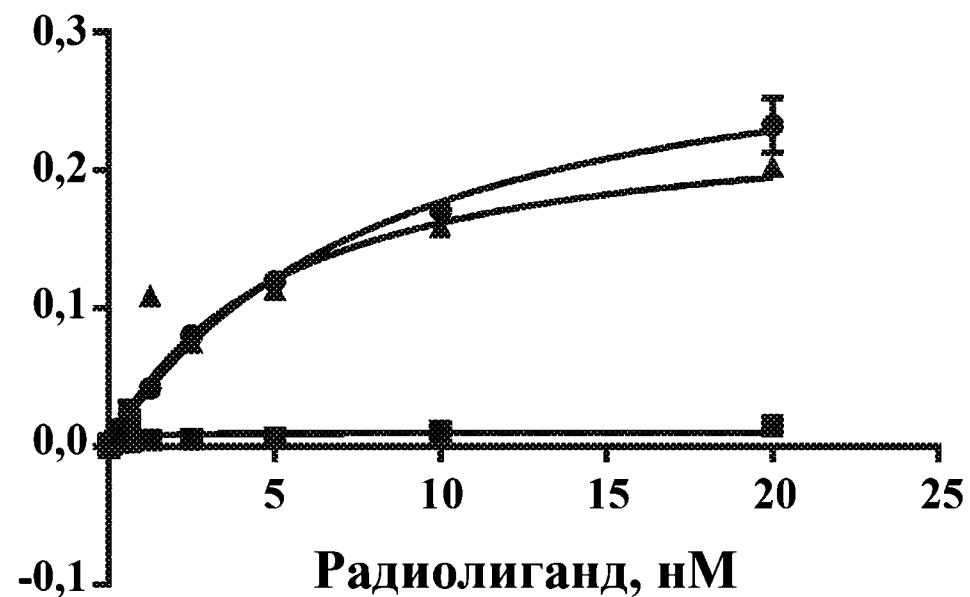


	Общее связывание	NSB	Специфическое связывание
Bmax	0,06481	~2454441154507	0,04191
Kd	2,799	~2,226e+015	1,361

0,2e6 рецепторов на клетку

Фиг. 7С

СНО-MICA №6 макака-крабоеда, 25000

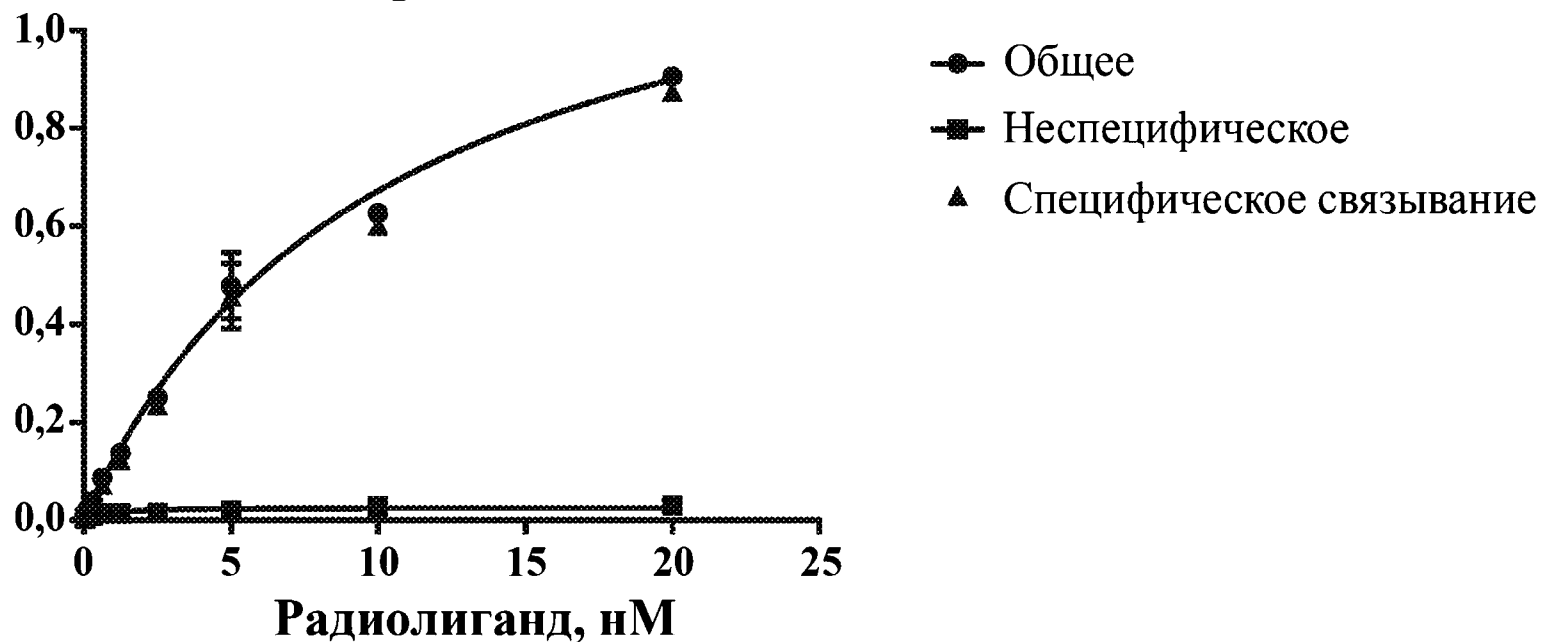


	Общее	Неспецифическое	Специфическое связывание
Bmax	0,3233	0,009976	0,2448
Kd	8,272	0,2264	5,123

587520 рецепторов/клетка

Фиг. 7D

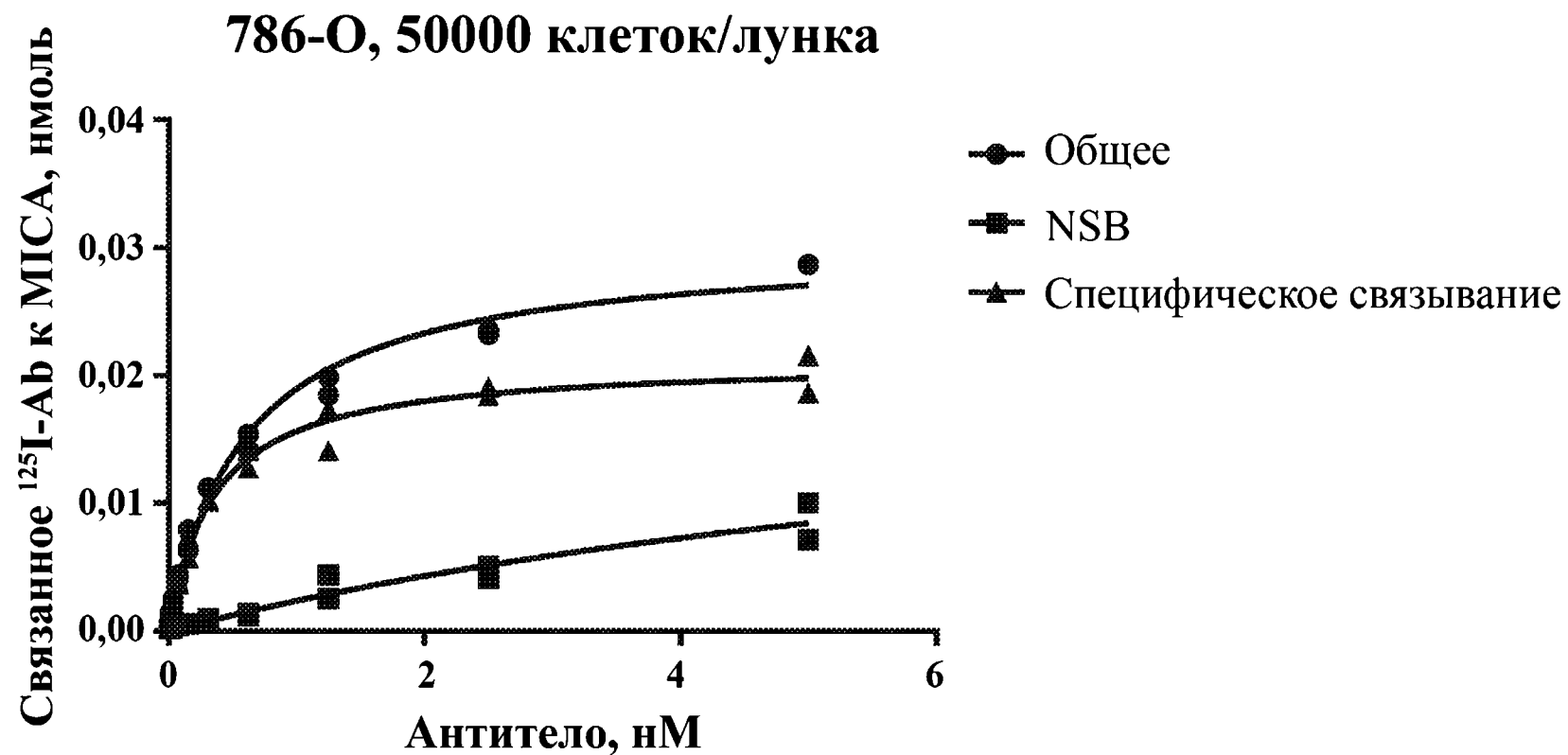
CHO-MICA №4
макака-крабоведа, 25000



	Общее	Неспецифическое	Специфическое связывание
B _{max}	1,361	0,02652	1,353
K _d	10,25	0,5731	11,04

3,25е6 рецепторов/клетка

Фиг. 7Е

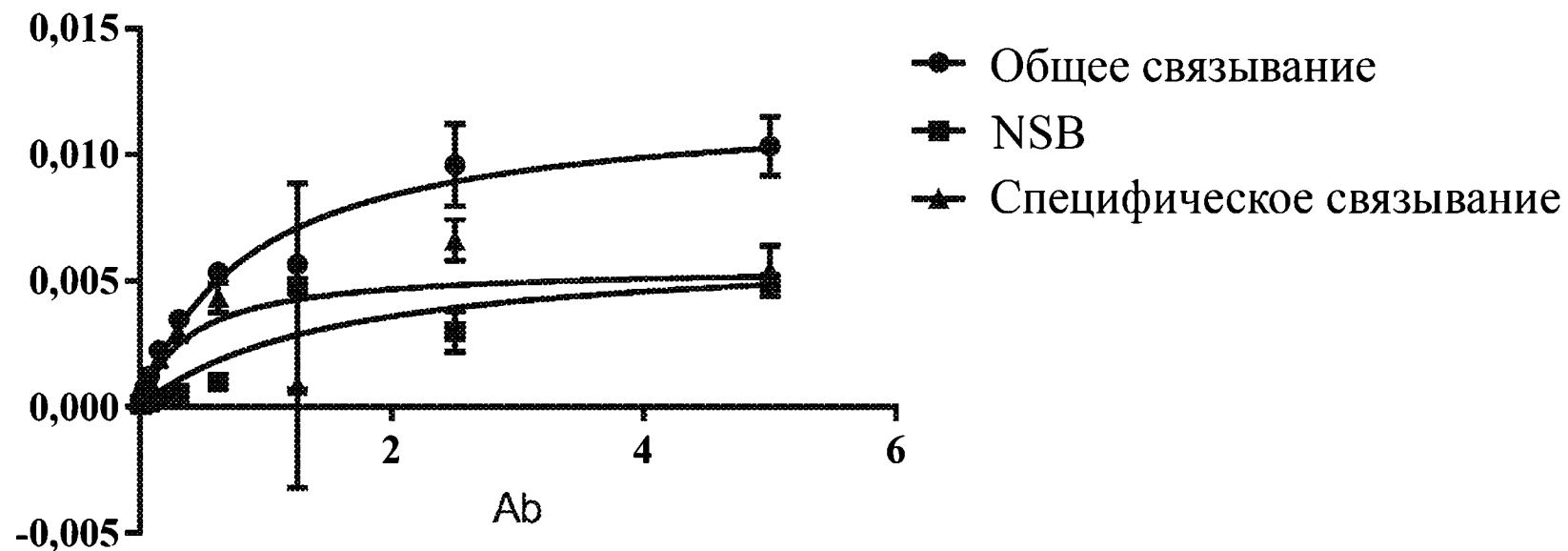


	Общее	NSB	Специфическое связывание
Bmax	0,03029	0,02339	0,0212
Kd	0,5996	8,829	0,3564

25440 рецепторов/клетка

Фиг. 7F

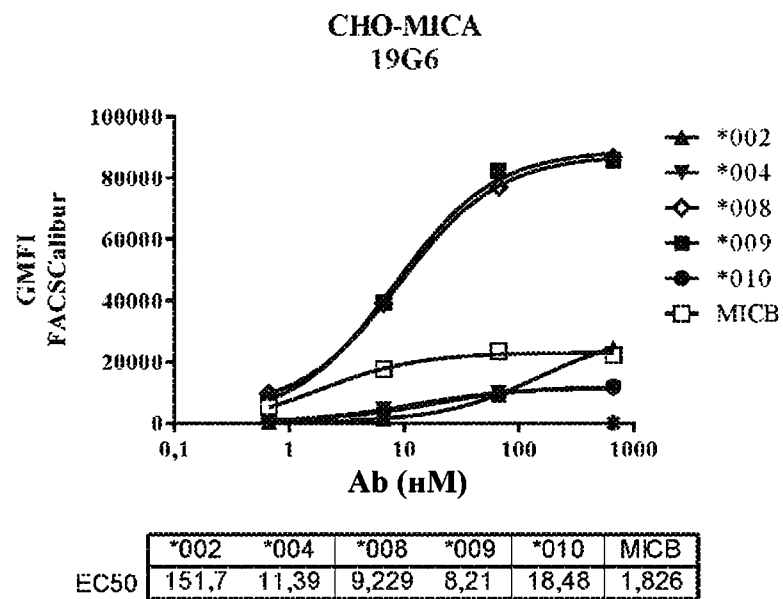
SW480, 25000 клеток/лунка



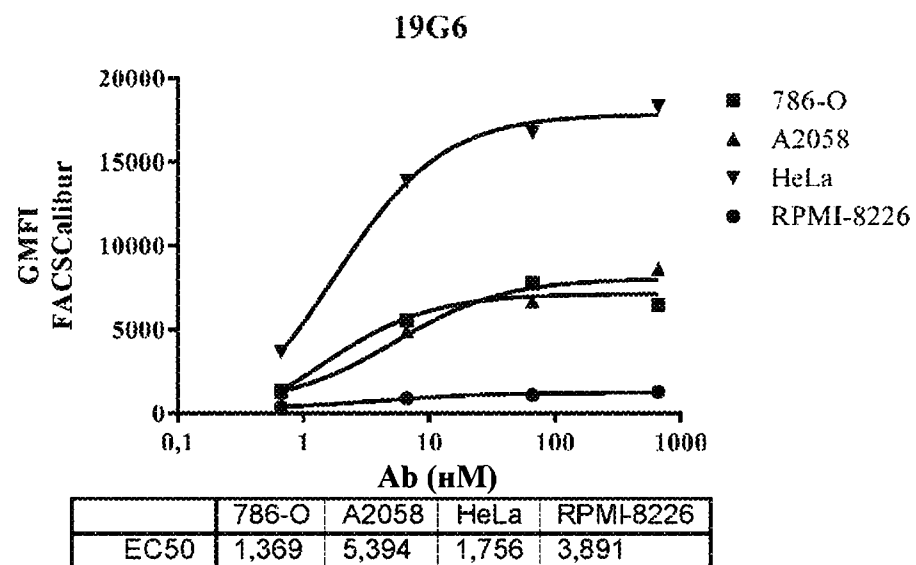
	Общее связывание	NSB	Специфическое связывание
Bmax	0,01205	0,006398	0,005568
Kd	0,8713	1,506	0,3852

13200 рецепторов/клетка

Фиг. 7G

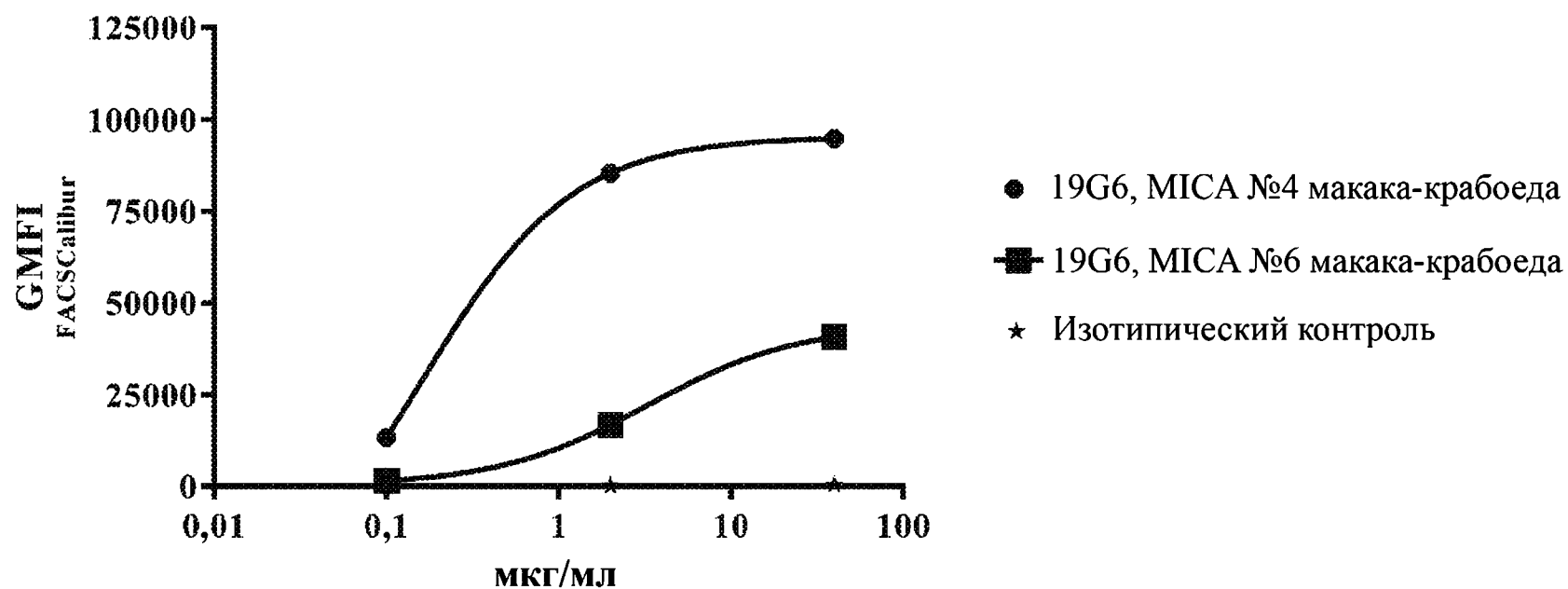


Фиг. 8А



Фиг. 8В

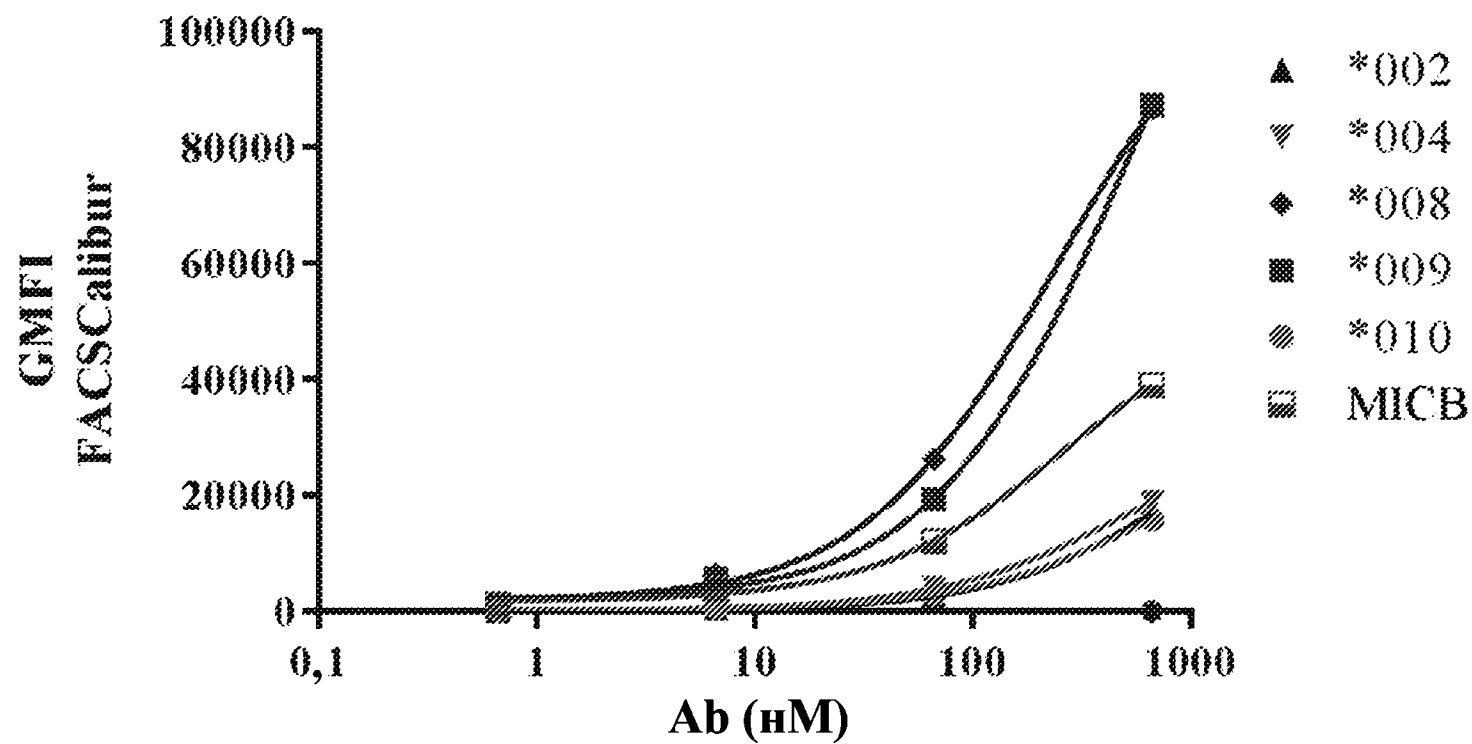
CHO-MICA №4 и №6 макака-крабоведа 19G6



	19G6 №4	19G6 №6
EC50	0,1614	3,303

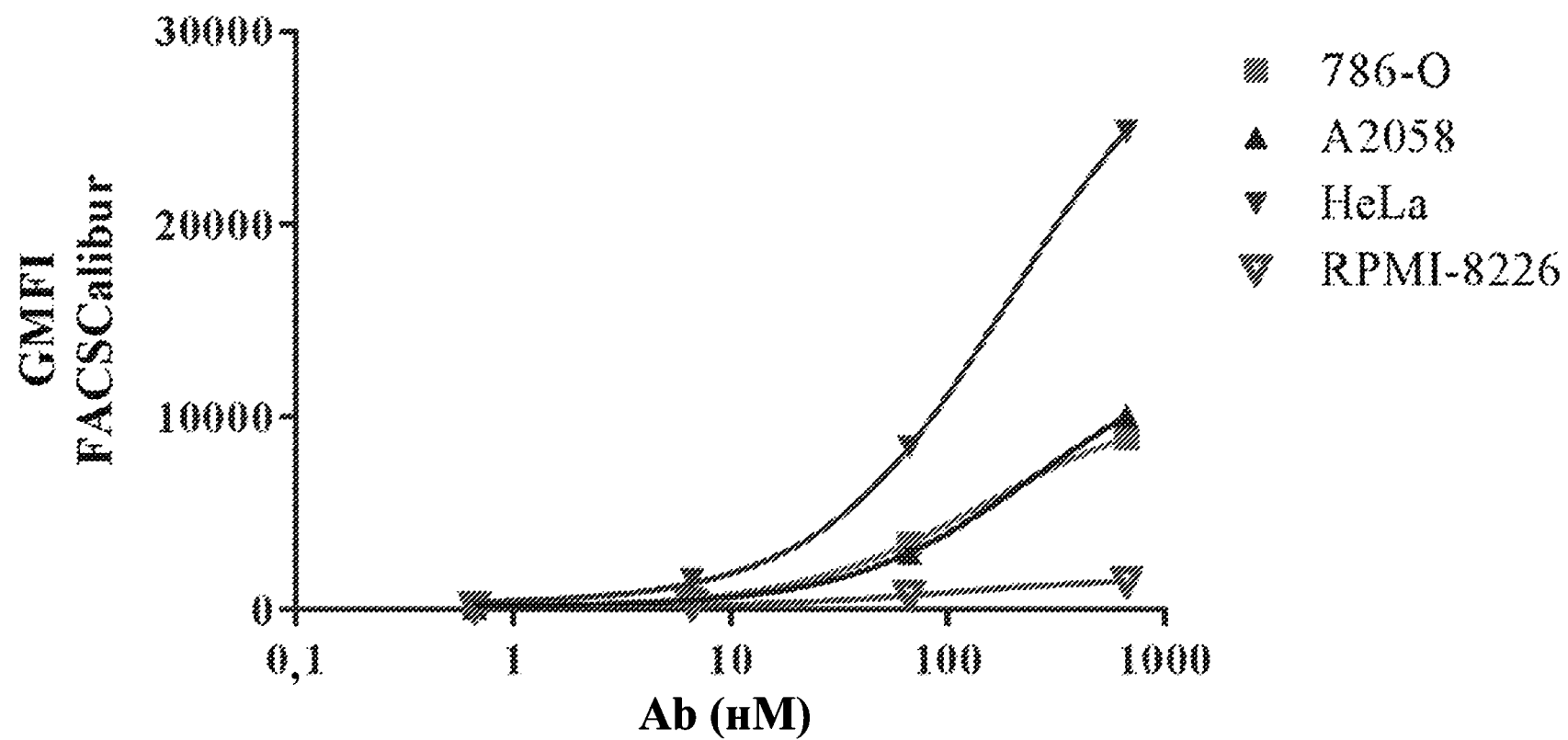
Фиг. 8С

CHO-MICA 24G11



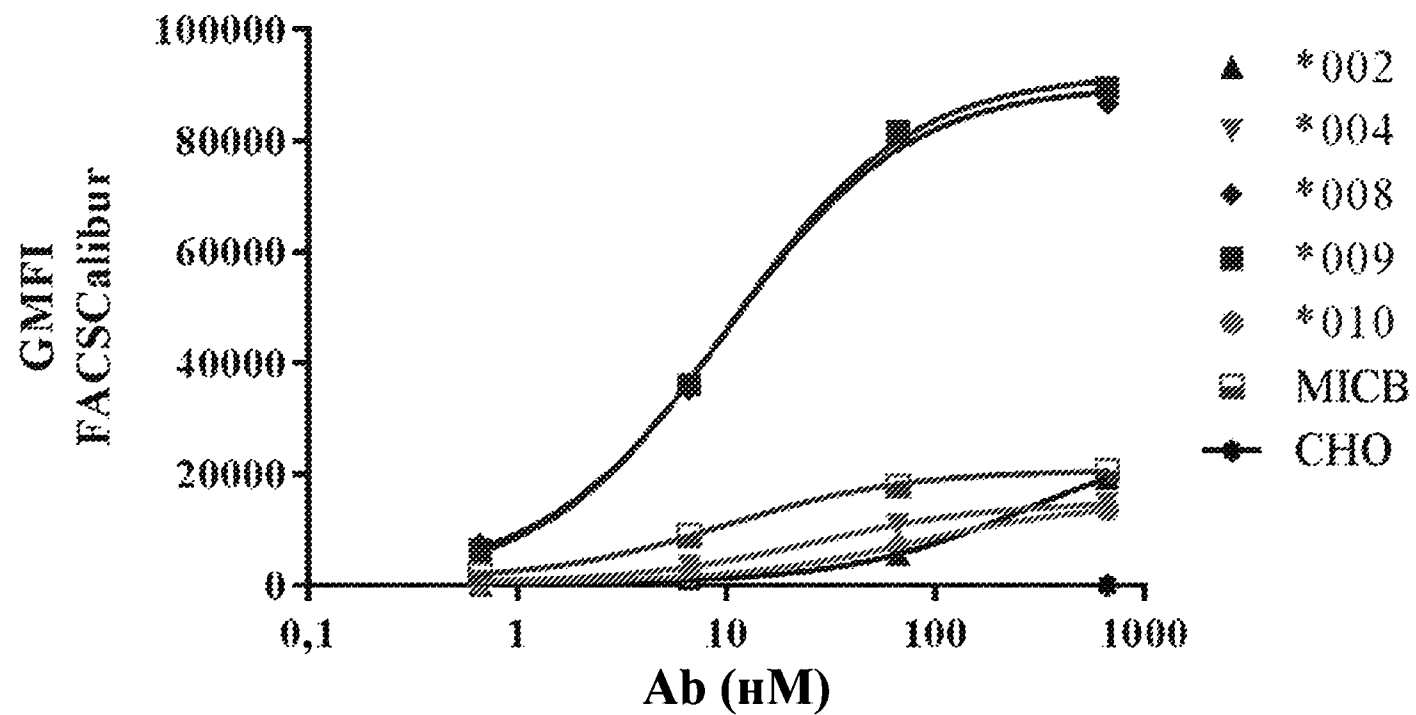
Фиг. 8D

24G11



Фиг. 8Е

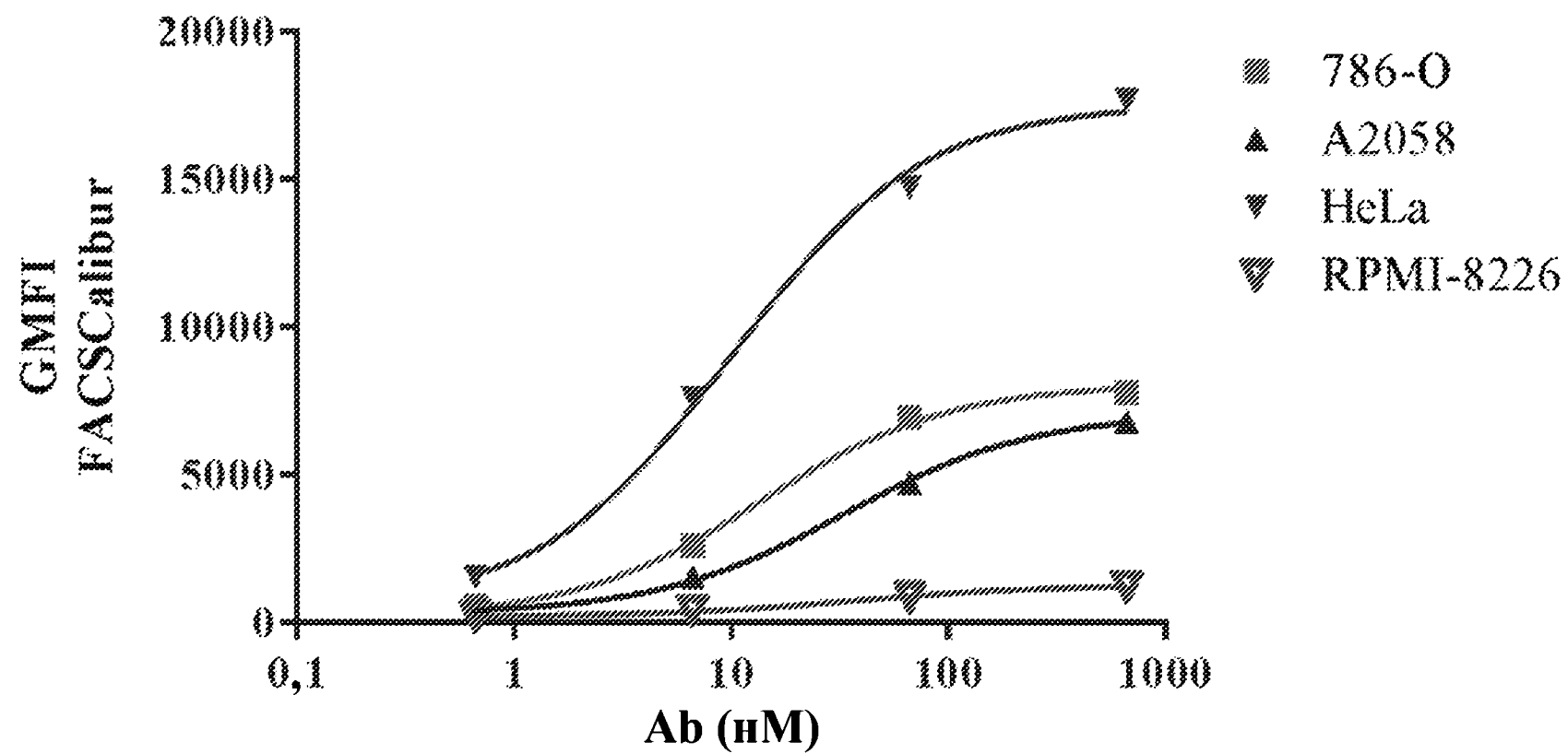
CHO-MICA 71C2



39/85

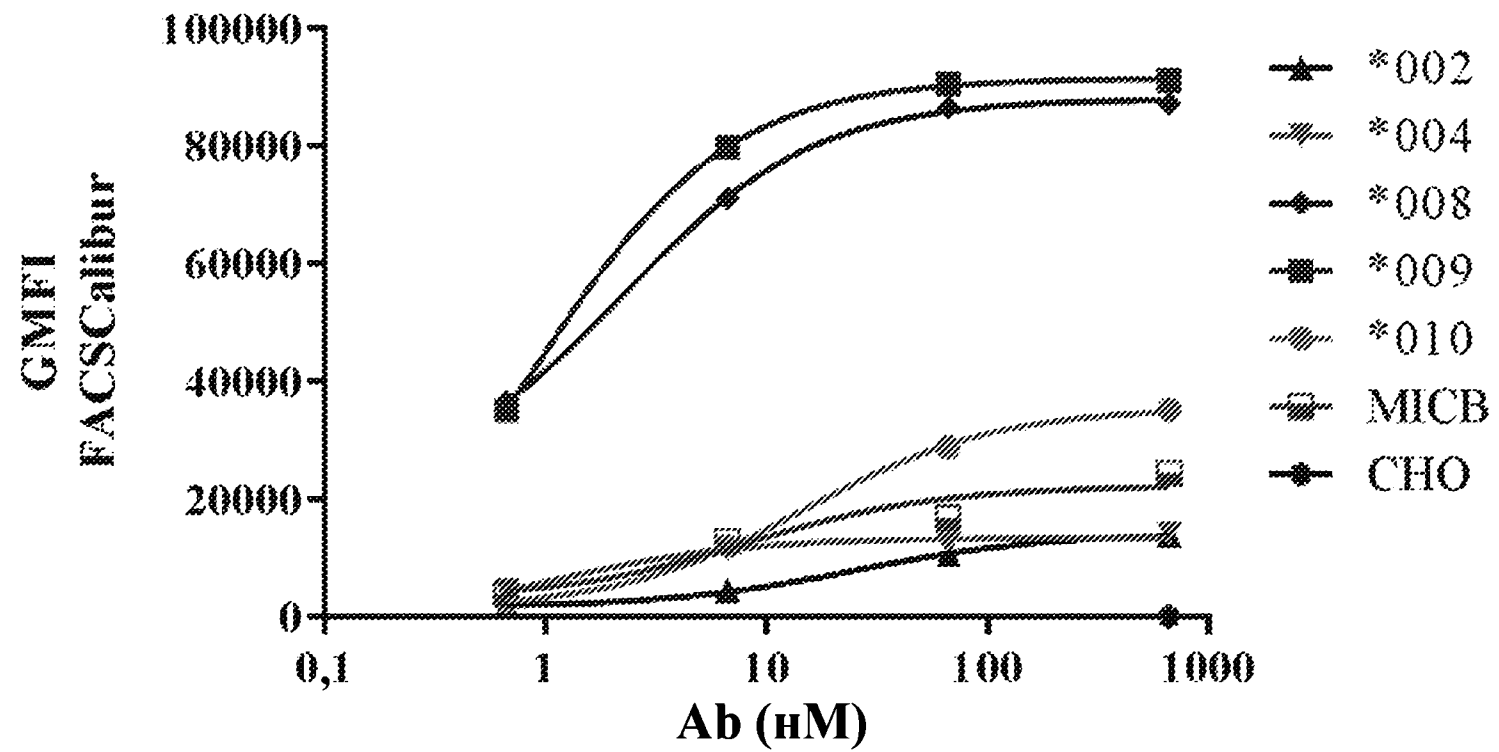
Фиг. 8F

71C2



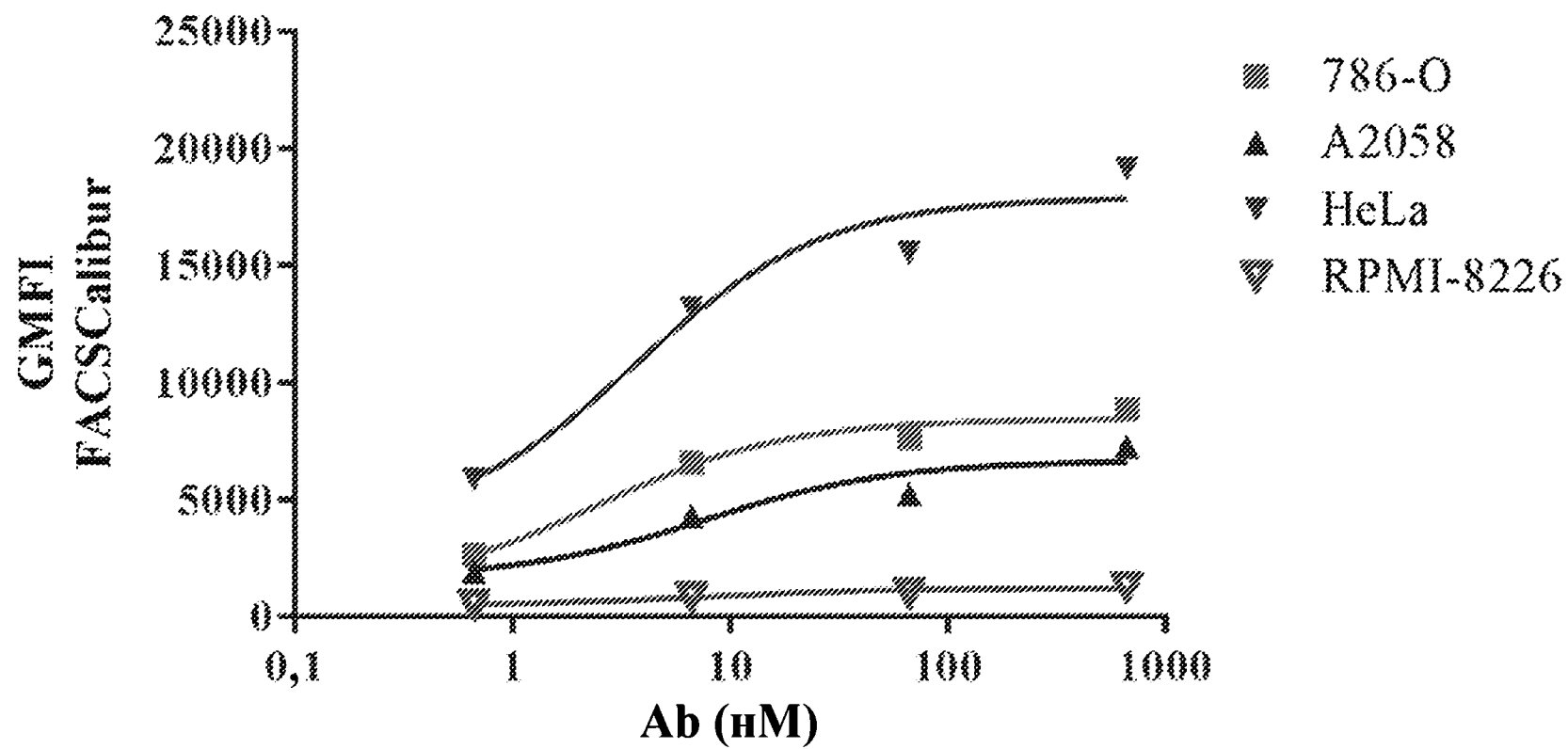
Фиг. 8G

CHO-MICA 16A5 (№1)



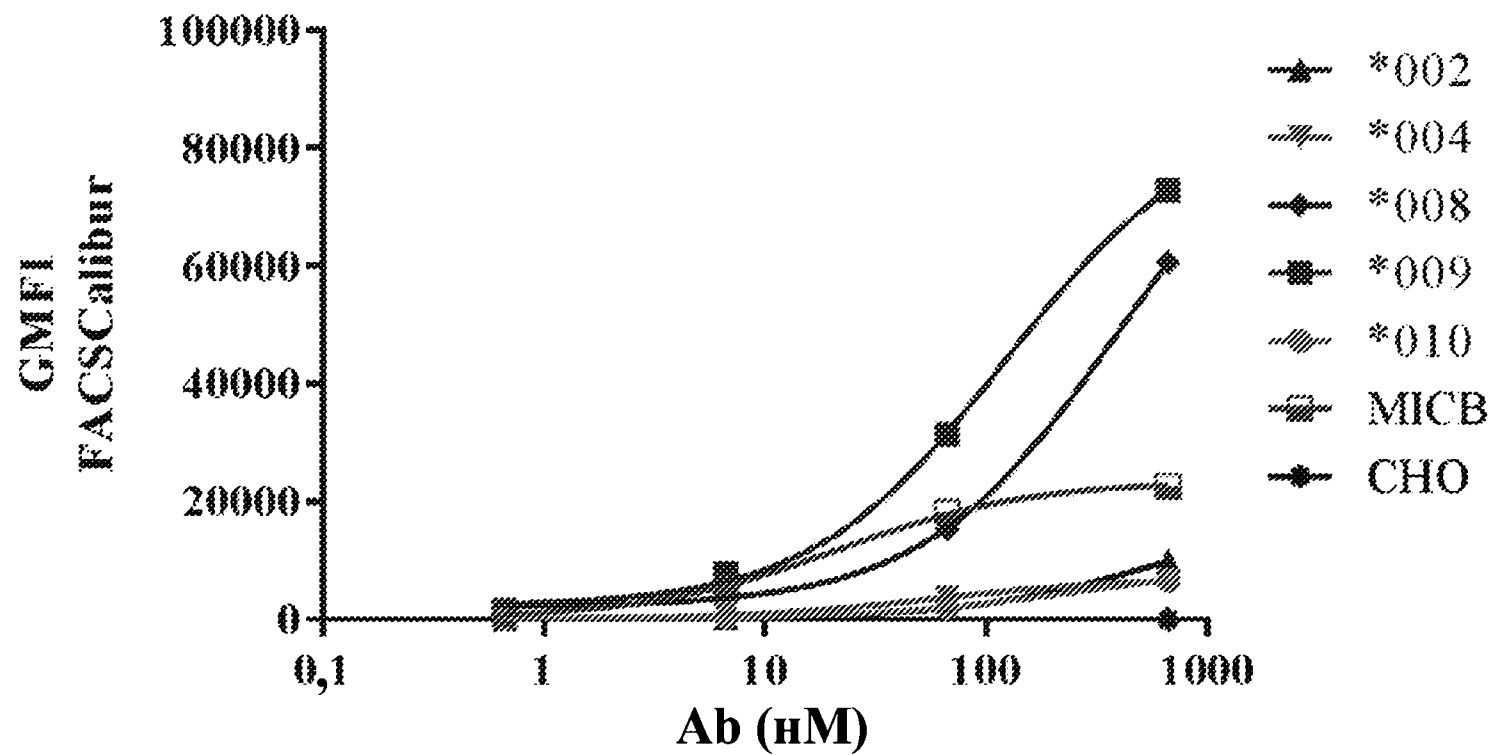
Фиг. 8H

16A5 (№1)

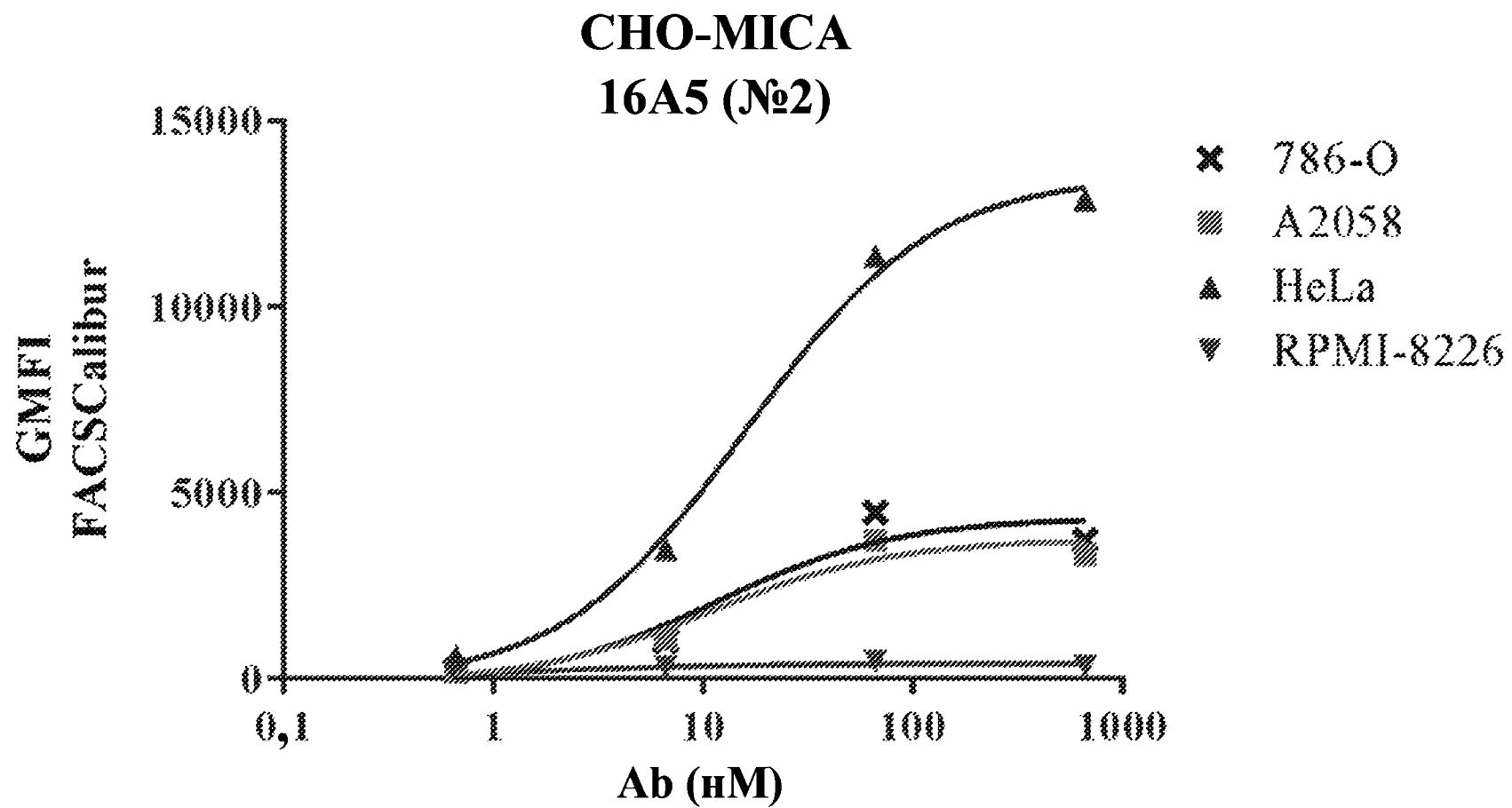


Фиг. 8I

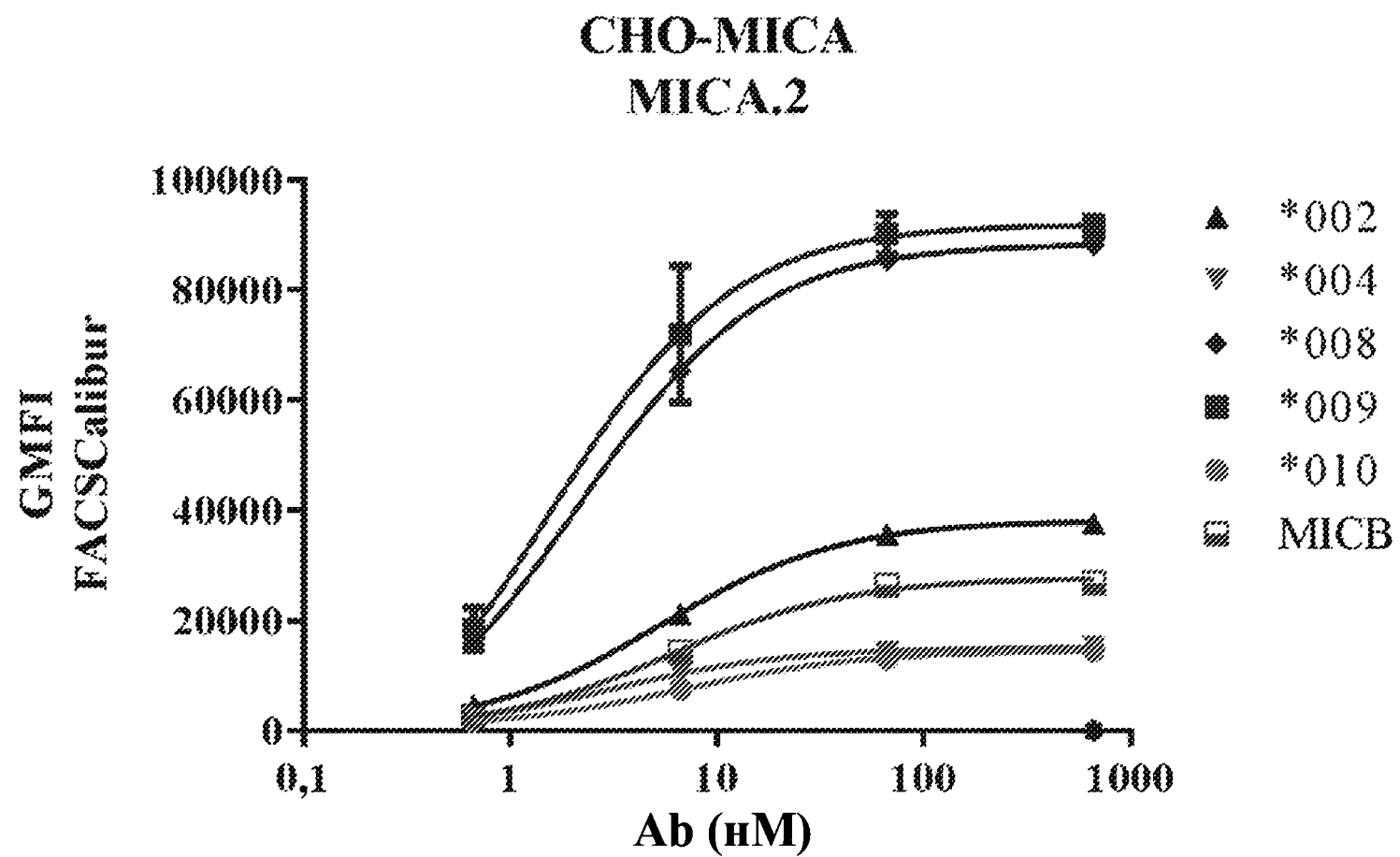
CHO-MICA 16A5 (№2)



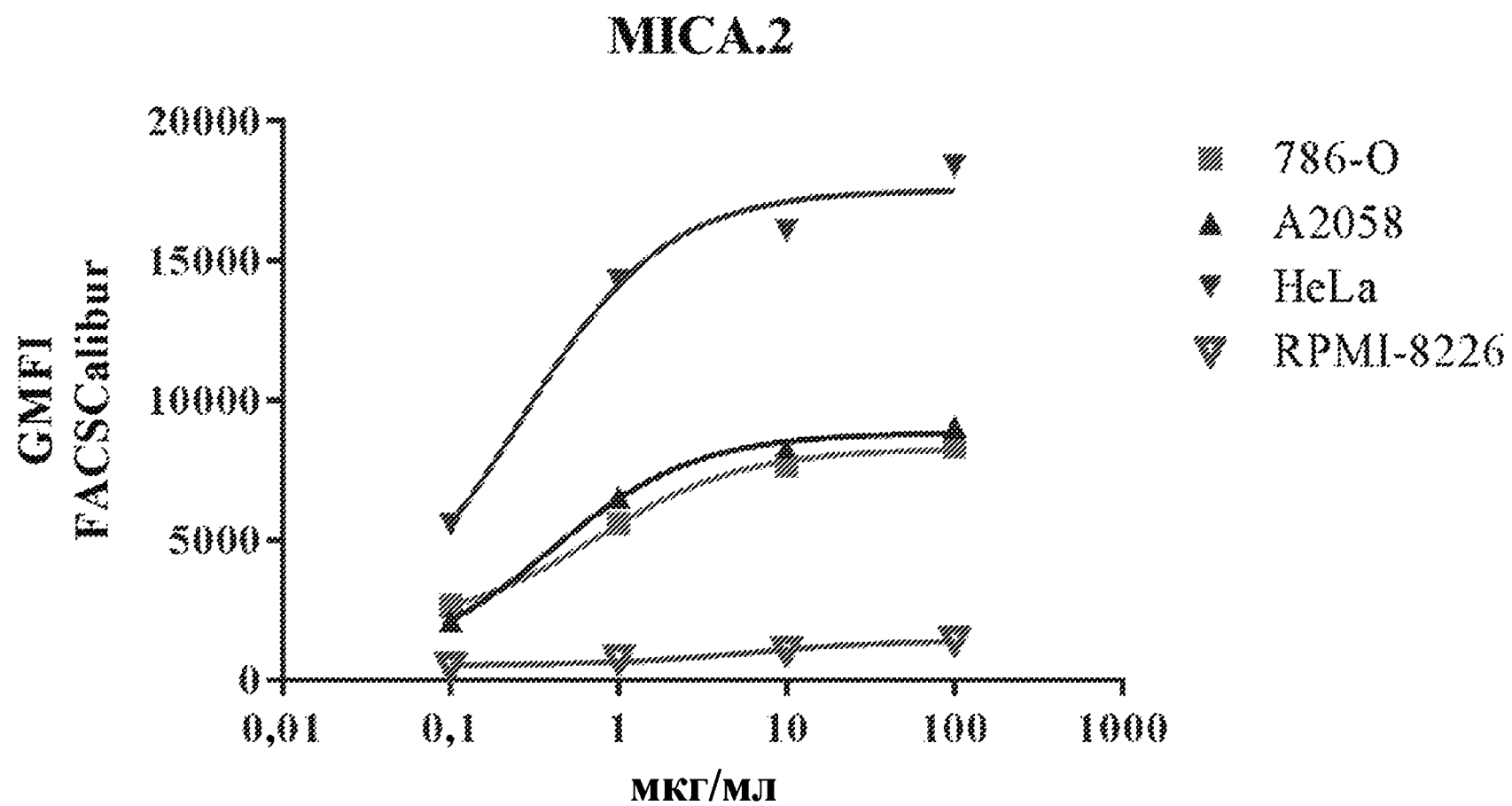
Фиг. 8J



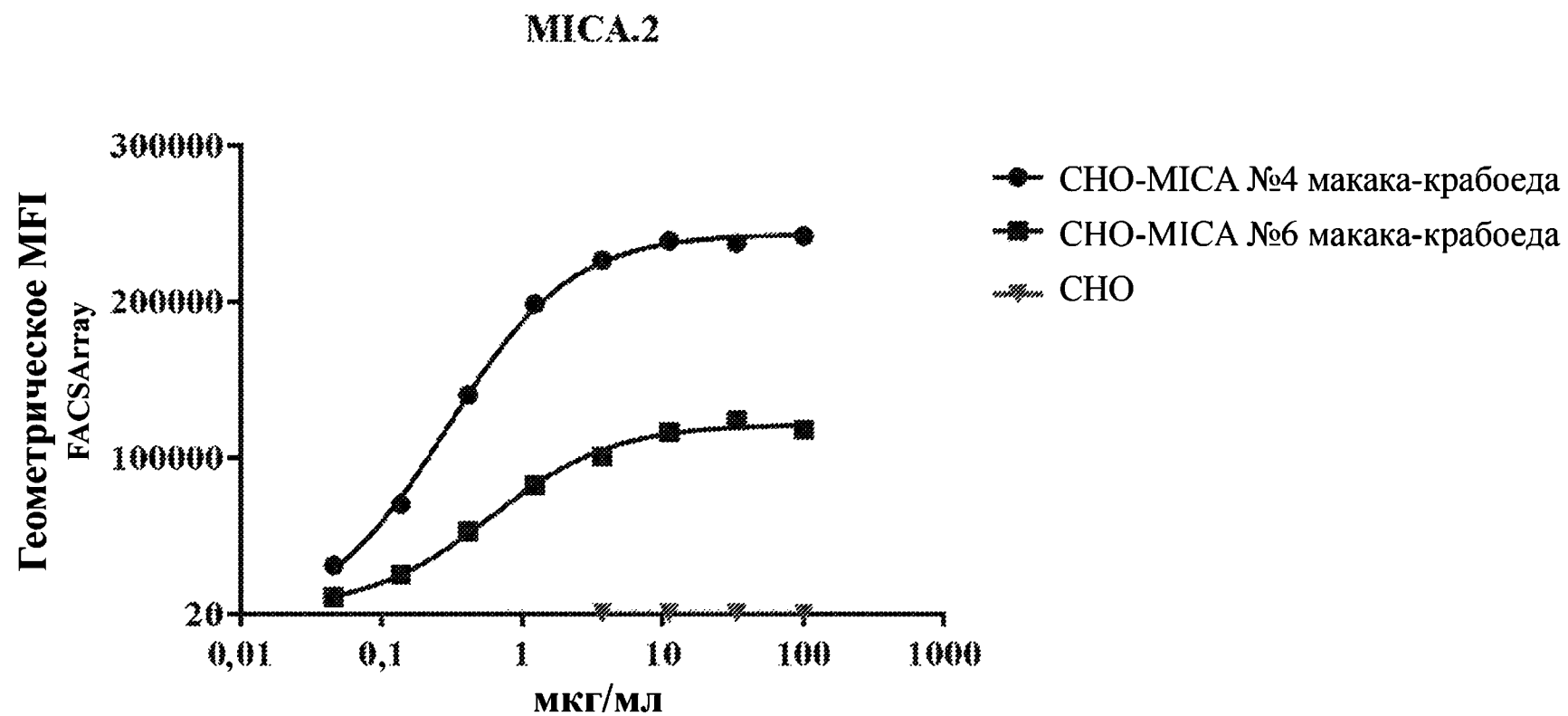
Фиг. 8К



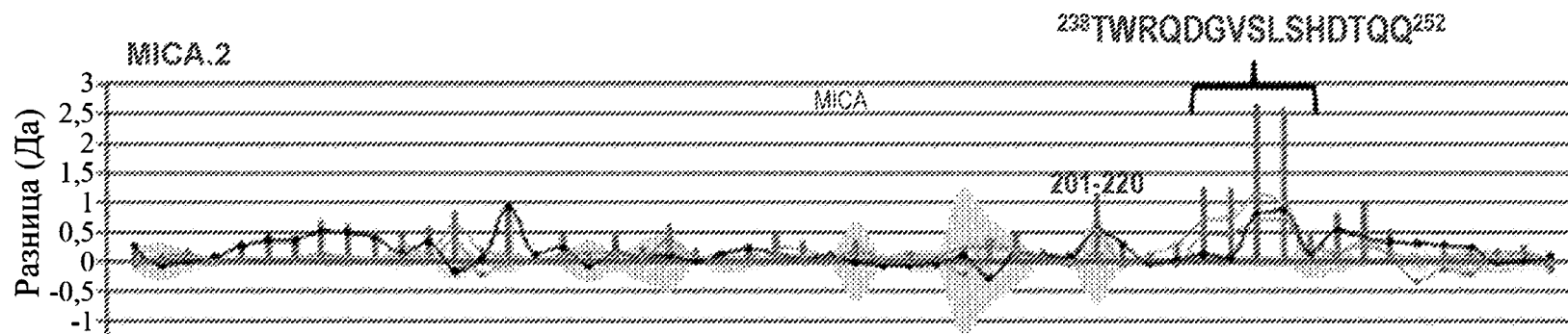
Фиг. 8L



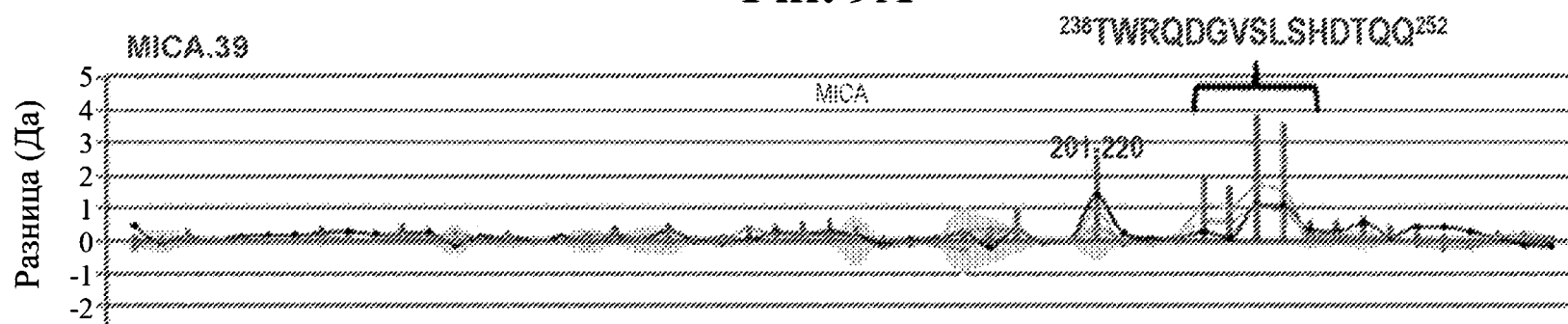
Фиг. 8М



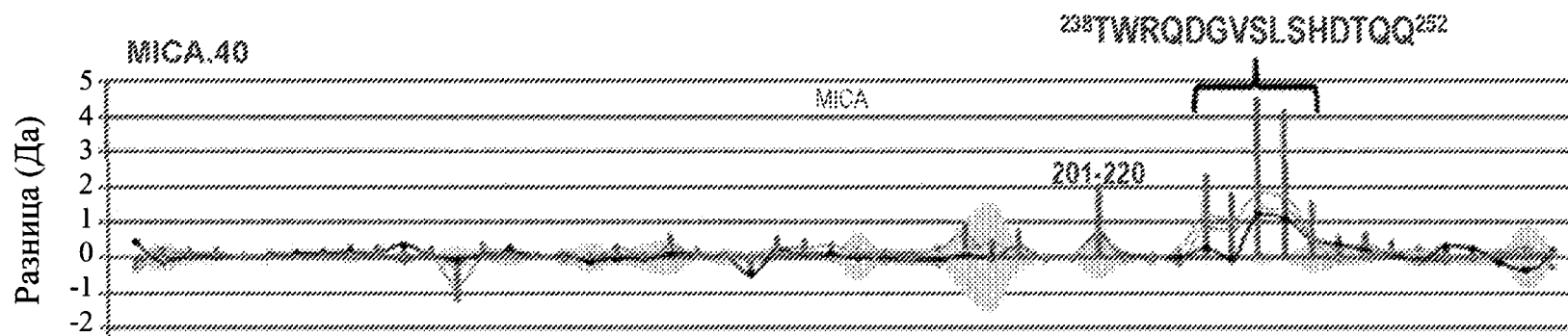
Фиг. 8N



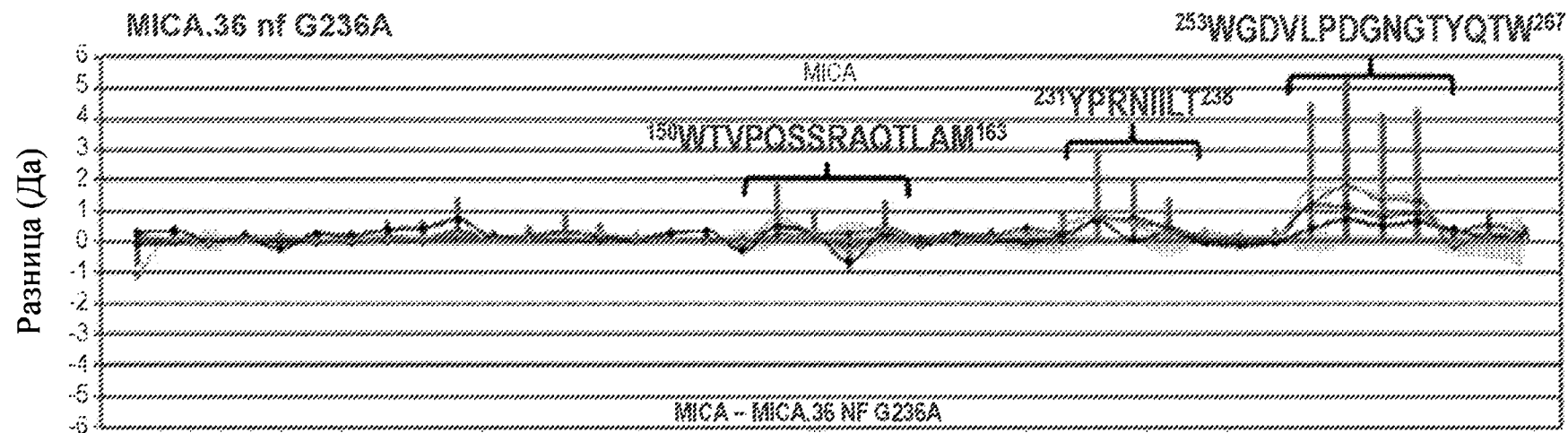
Фиг. 9А



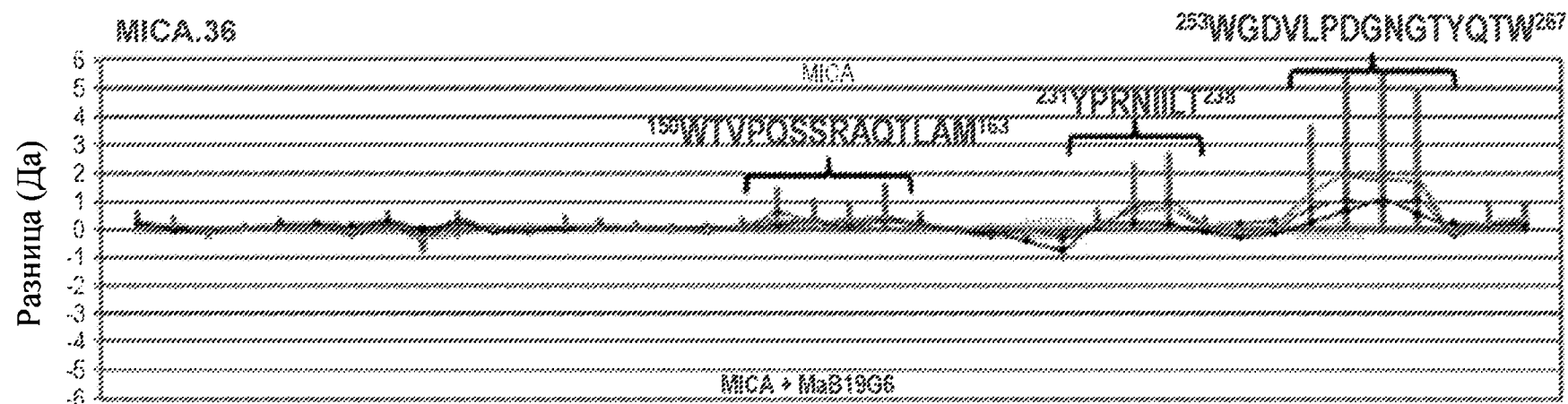
Фиг. 9В



Фиг. 9С

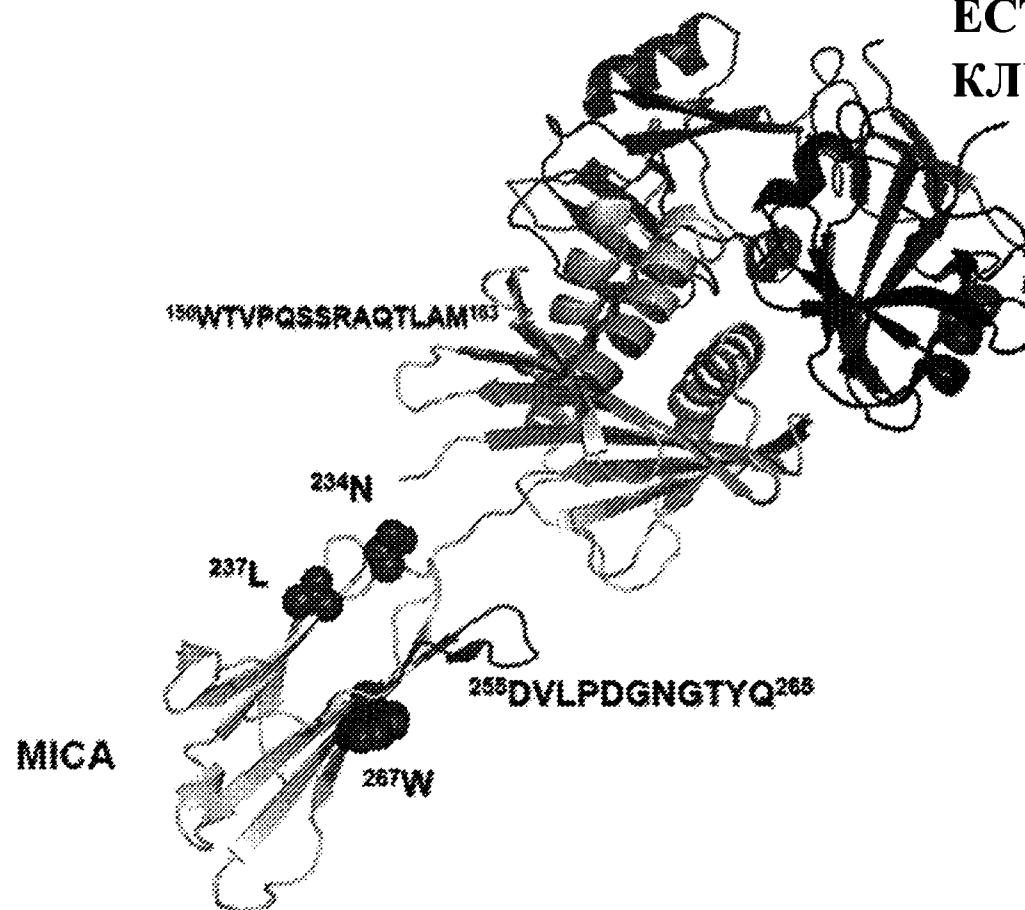


Фиг. 9D



Фиг. 9E

РЕЦЕПТОР NKG2D ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ



Порядок
защиты



Фиг. 9F

1 MGLGEVFLLL AGIEPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
61 RQKCRAPQGG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHKDQKEGL HSLQEIRVCE
121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVPQSSRAQT LAMNVRNFK EDAMKTKTHY
181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPFPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASSF YPRNIILTWR
241 QDGVSLSHDT QQWGDVLLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
301 LVLQSHWQTF HVSAVAAGCC YFCYYYELCP LL

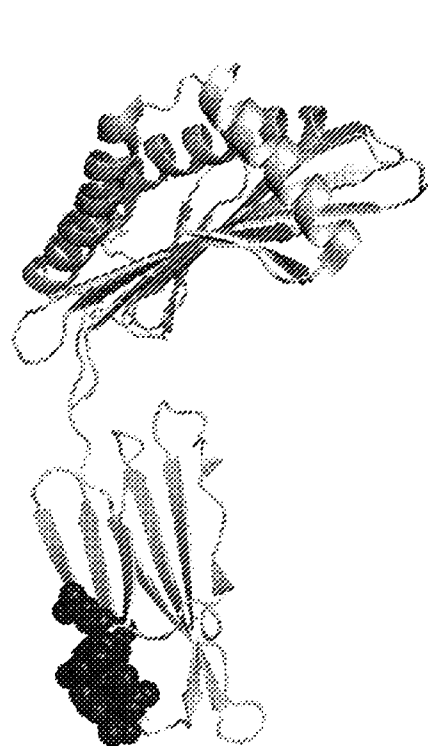
Фиг. 10А

1 MGLGPVLELL AGIFPFAPFG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
61 RQKCRAPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE
121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVFQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY
181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASST YPRNIILTWR
241 QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQR TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
301 LVLQSHWQTF HVSAVAAGCC YFCYYYFLCP LL

Фиг. 10В

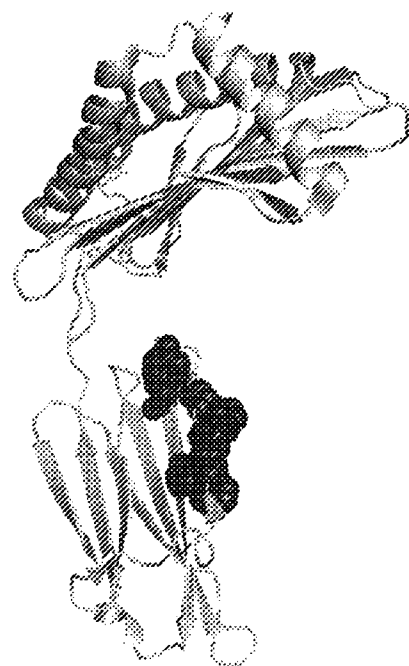
1 MGLGPVFLLL AGIEPFAPFG AAAEFHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
 61 RQKCRAPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHKNDQKEGL HSLQEIRVCE
 121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY
 181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPFMVN VTRSEASEGN ITVTCRASSE YPRNIILTWR
 241 QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQRF TCYMEHSGNH STHFVPSGKV
 301 LVLQSHWQTF HVSAVAAGCC YFCYYYFLCP LL

Фиг. 10С



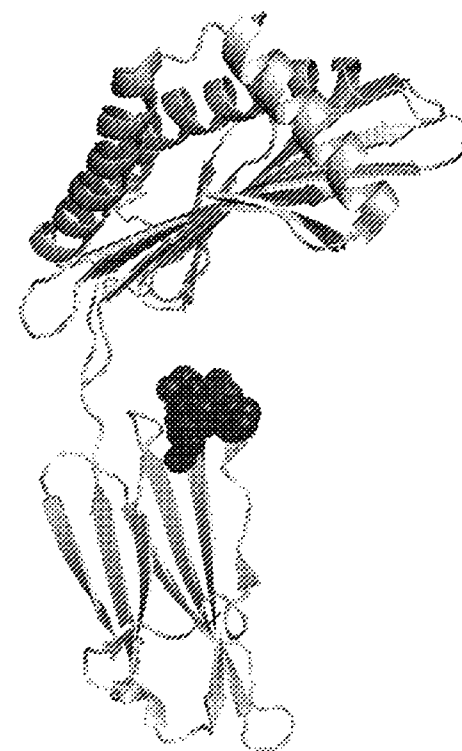
MICA.2

Фиг. 10D



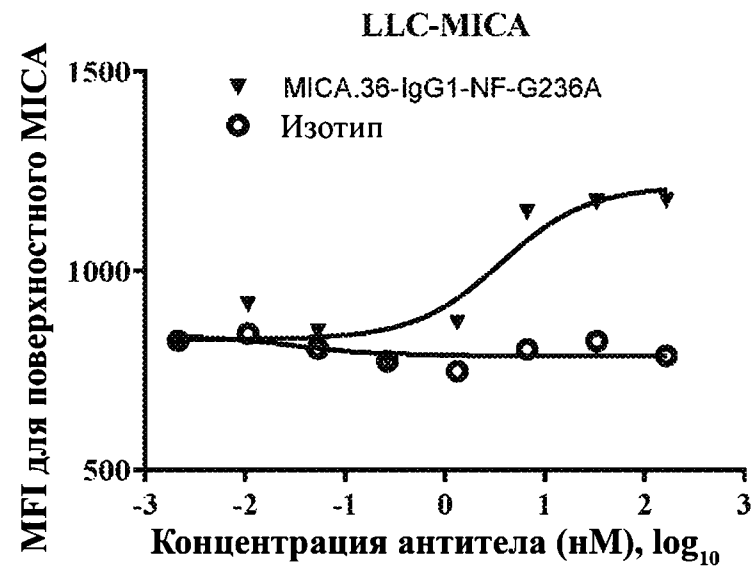
MICA.36

Фиг. 10E

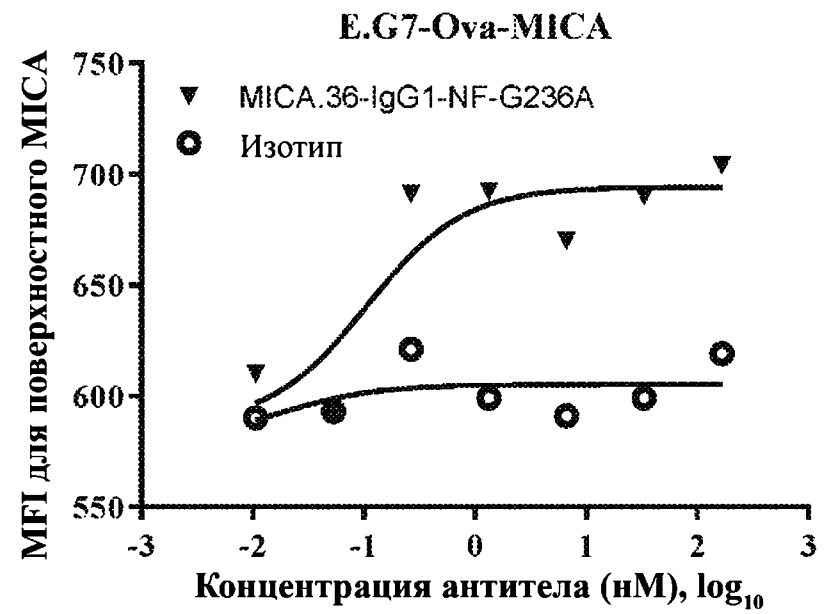


24G11

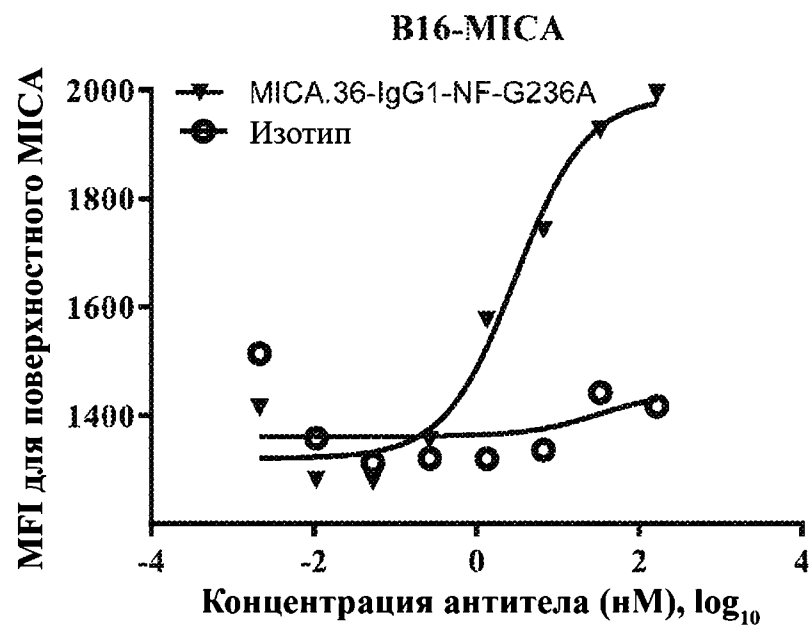
Фиг. 10F



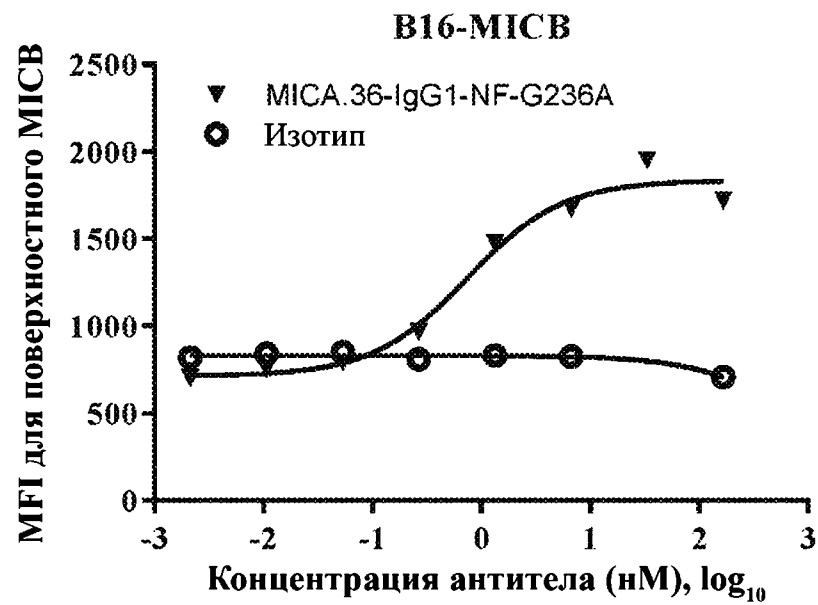
Фиг. 11А



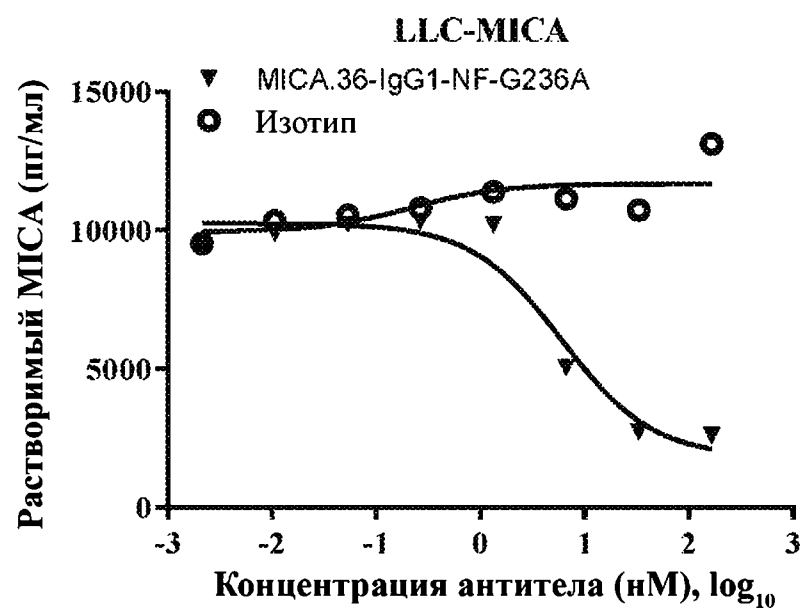
Фиг. 11В



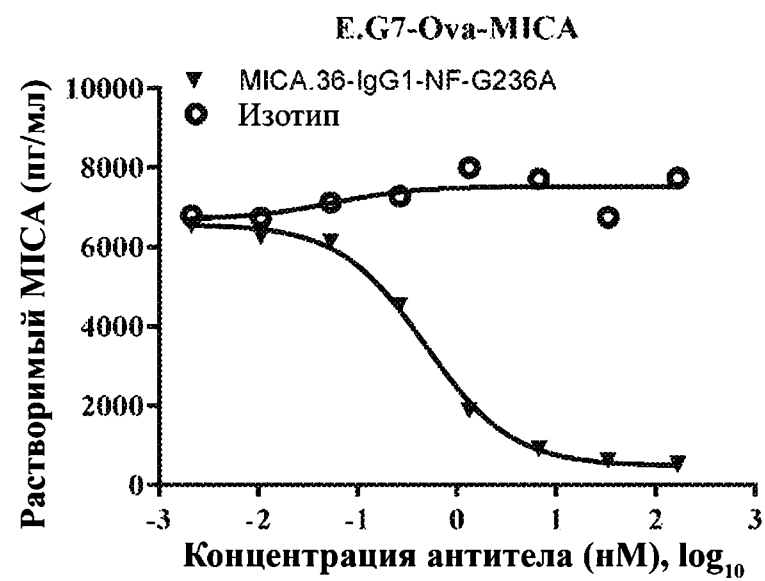
Фиг. 11C



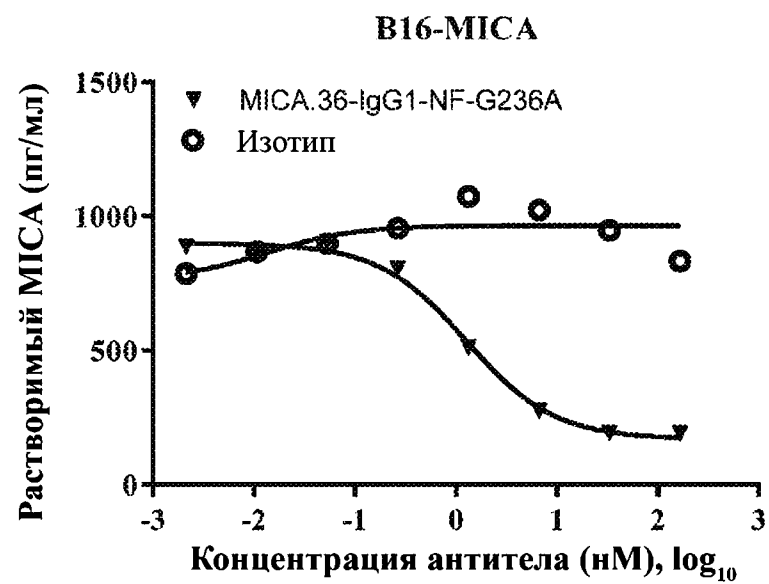
Фиг. 11D



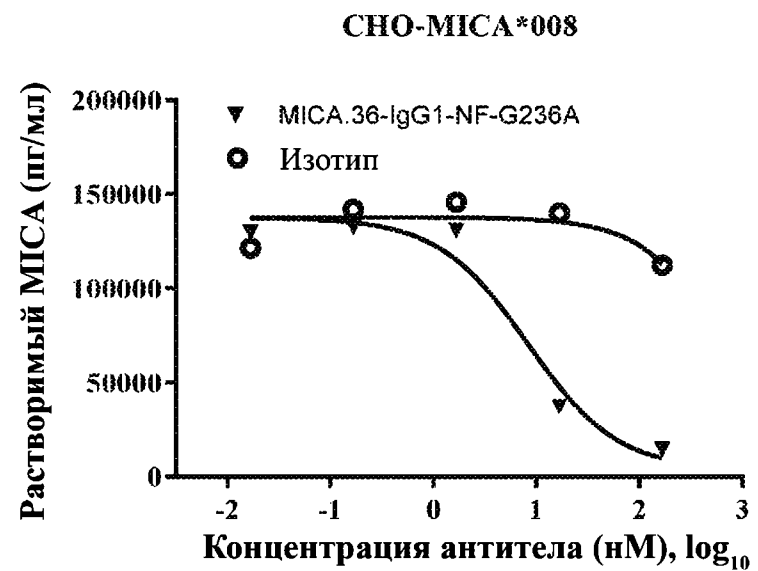
Фиг. 12А



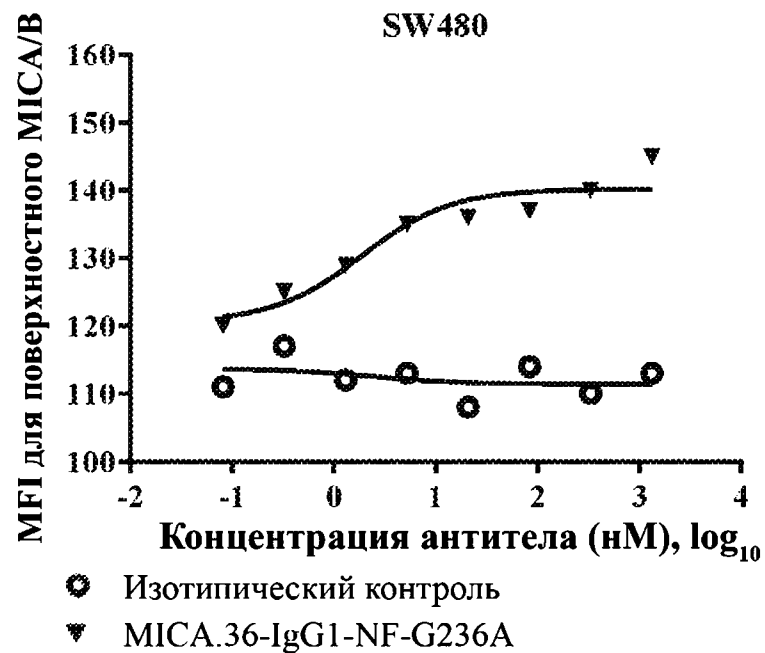
Фиг. 12В



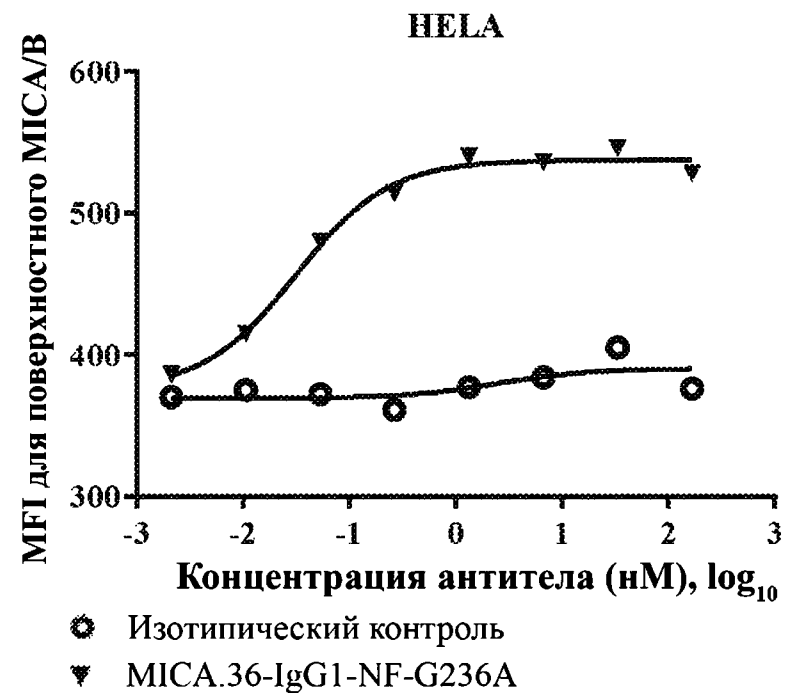
Фиг. 12С



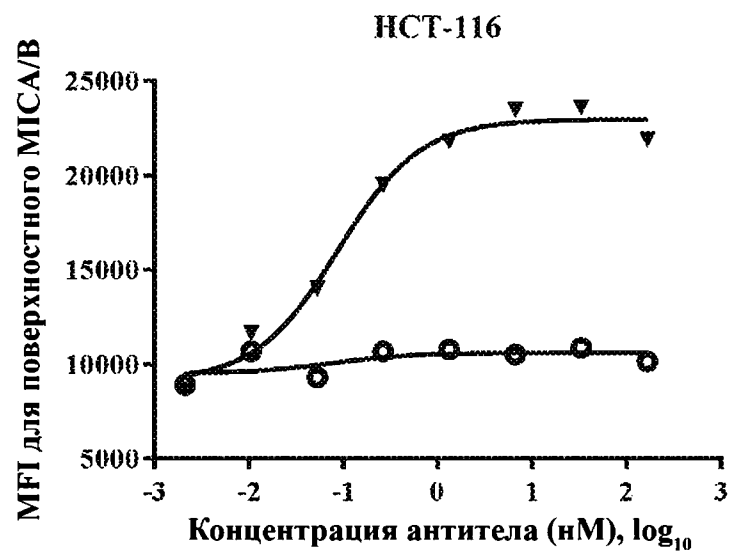
Фиг. 12D



Фиг. 13А

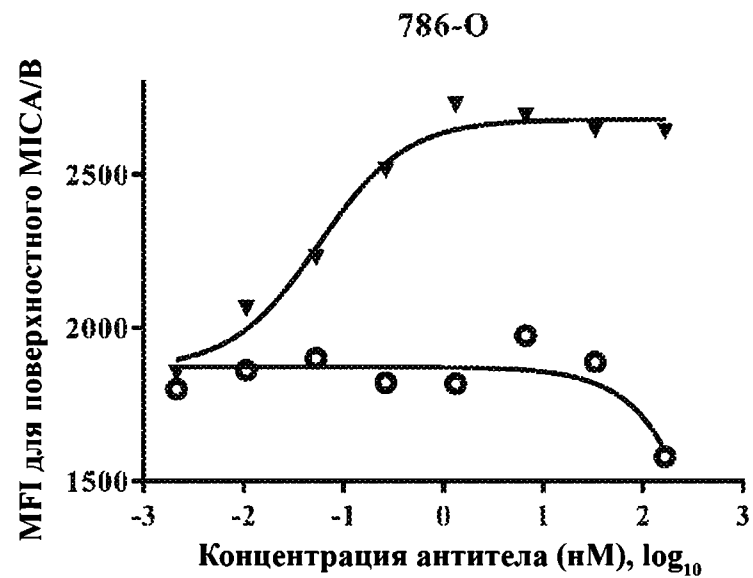


Фиг. 13В



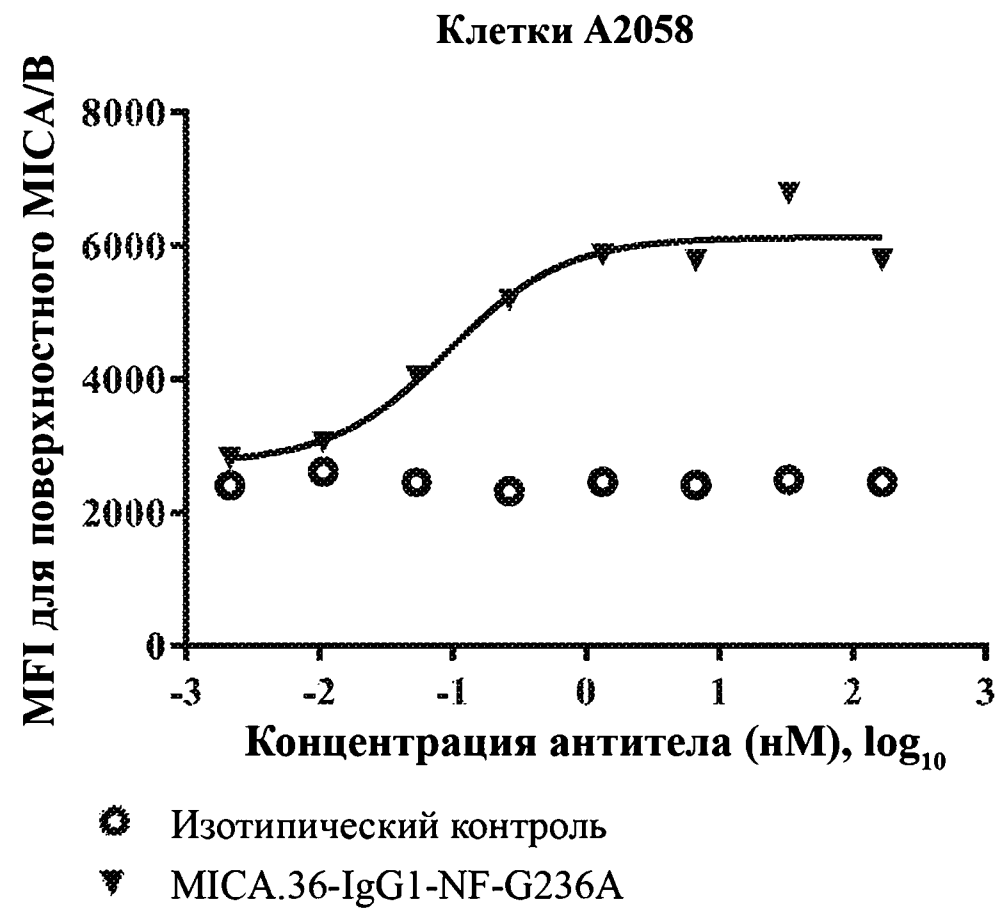
- Изотипический контроль
- ▼ MICA.36-IgG1-NF-G236A

Фиг. 13С

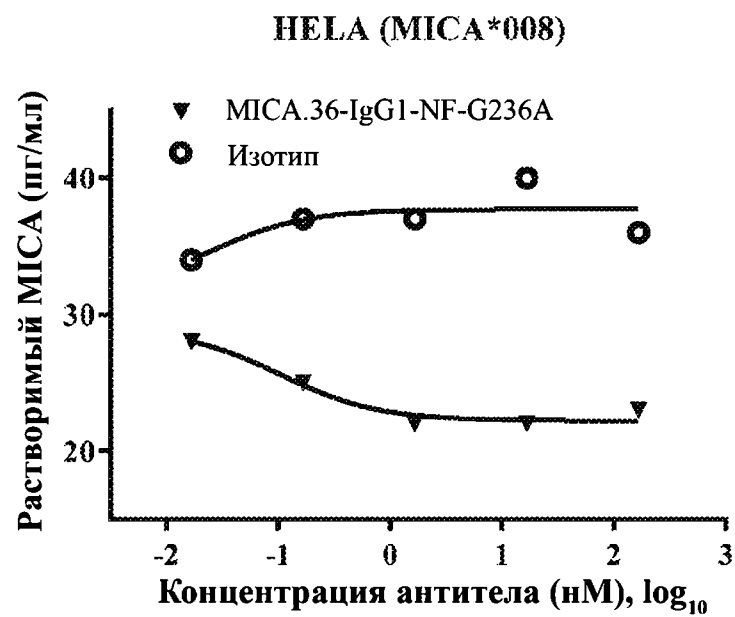


- Изотипический контроль
- ▼ MICA.36-IgG1-NF-G236A

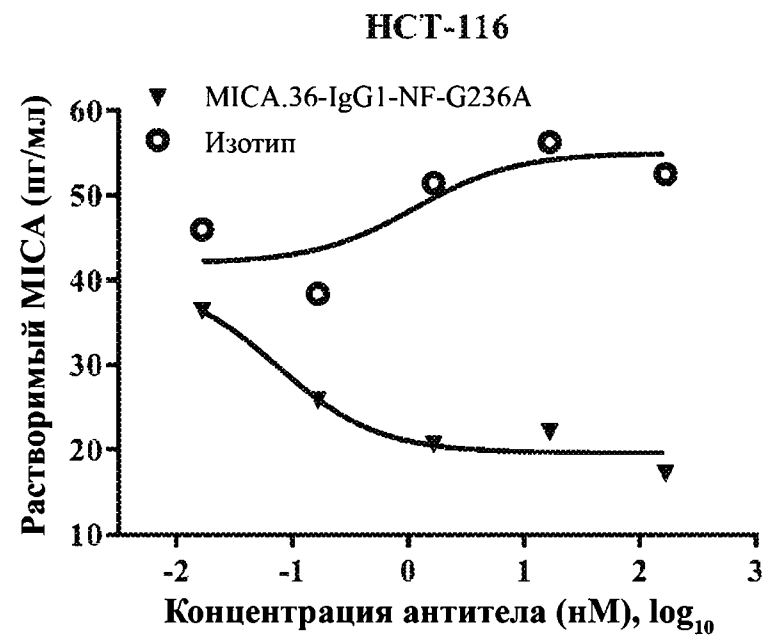
Фиг. 13D



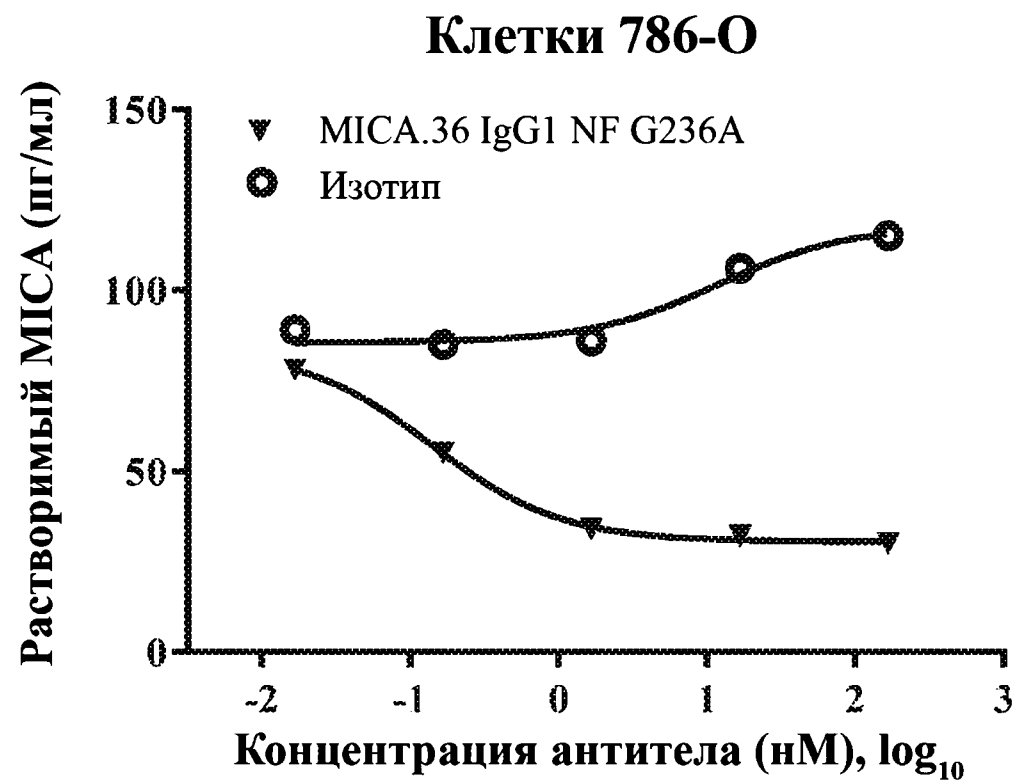
Фиг. 13Е



Фиг. 14А

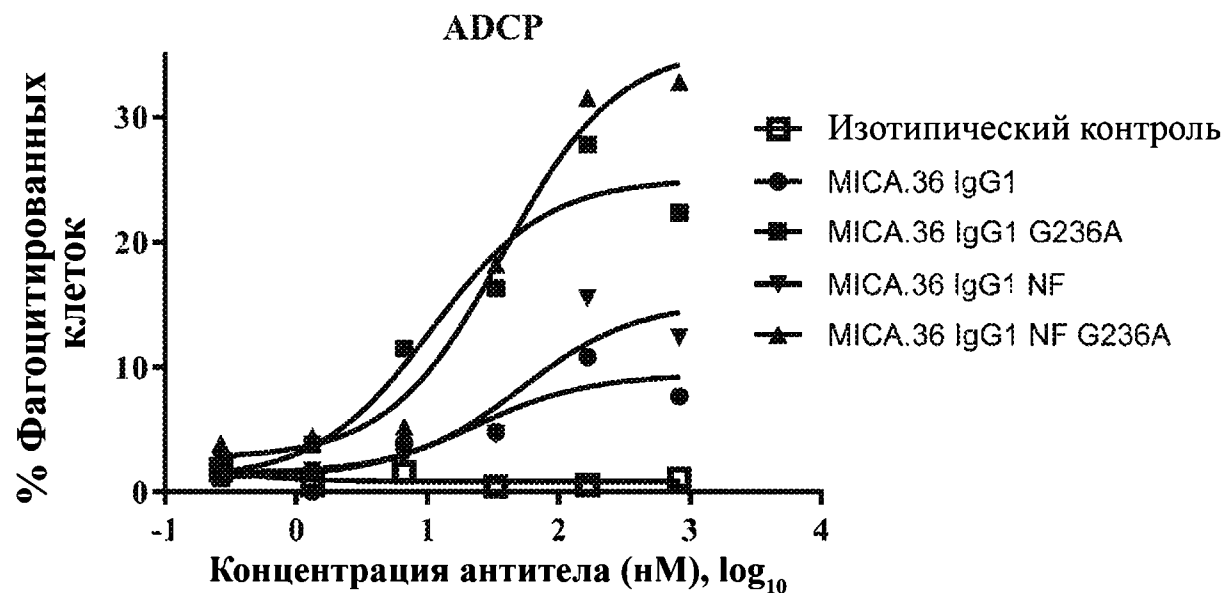


Фиг. 14В



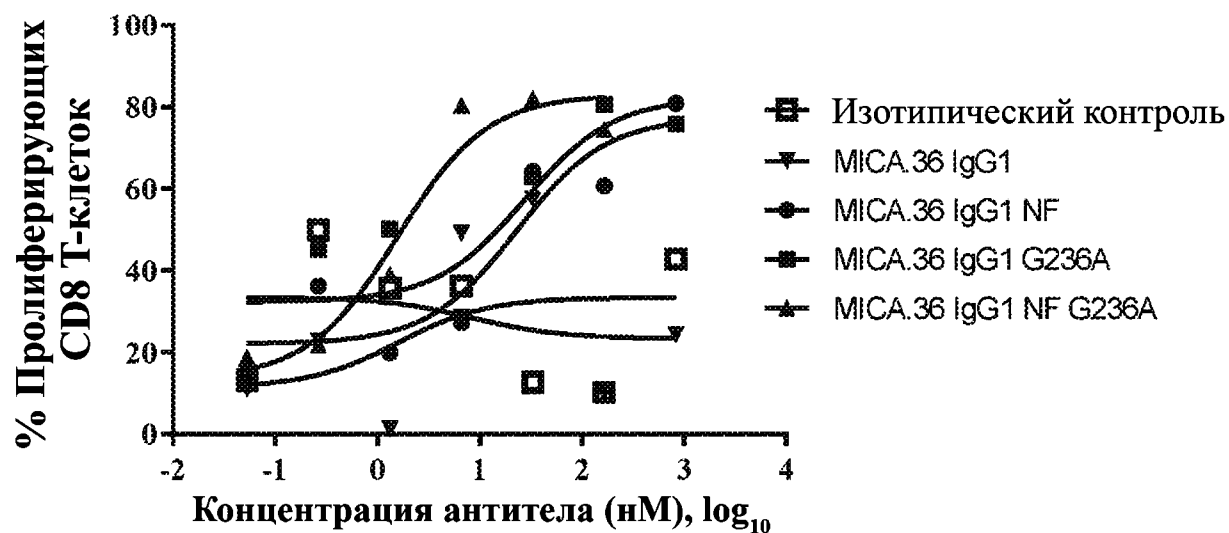
Фиг. 14С

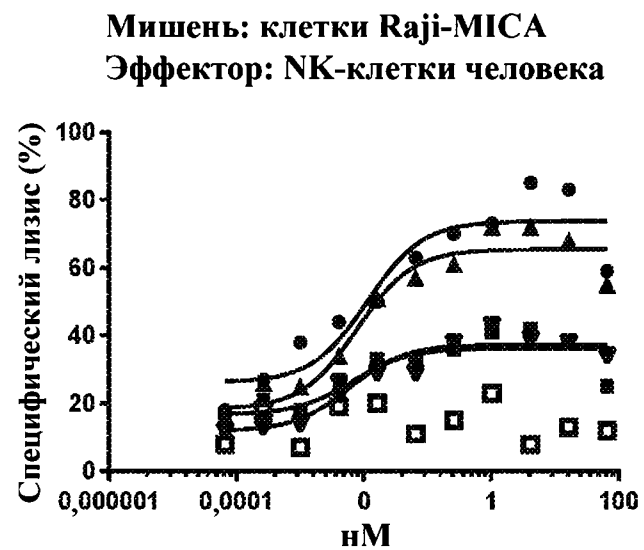
Фиг. 15А



Перекрестное представление антигена

Фиг. 15В



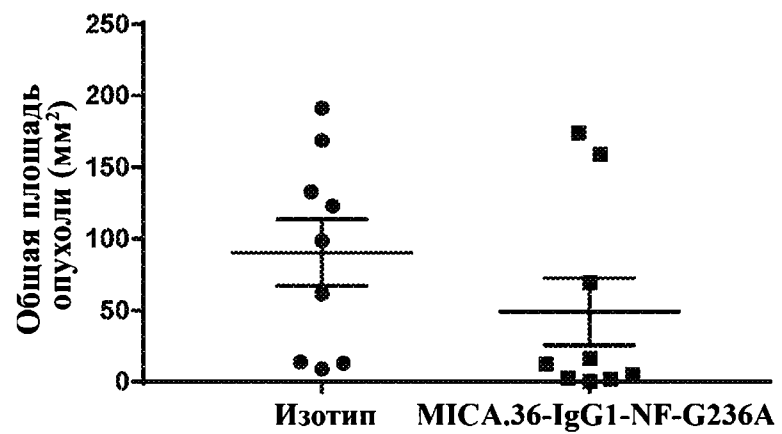


Фиг. 16А

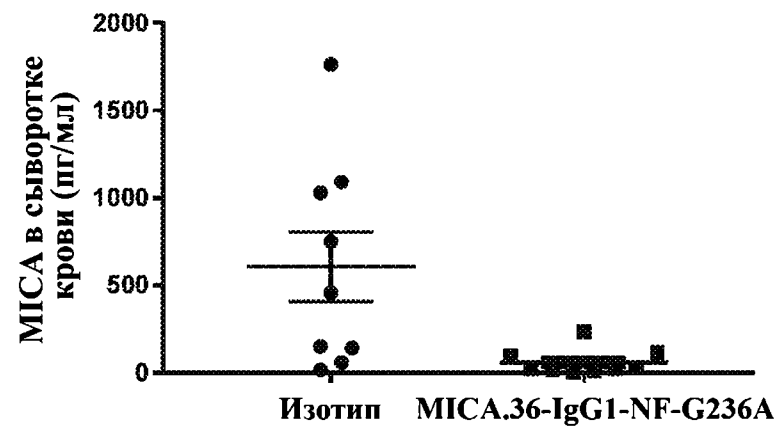


Фиг. 16В

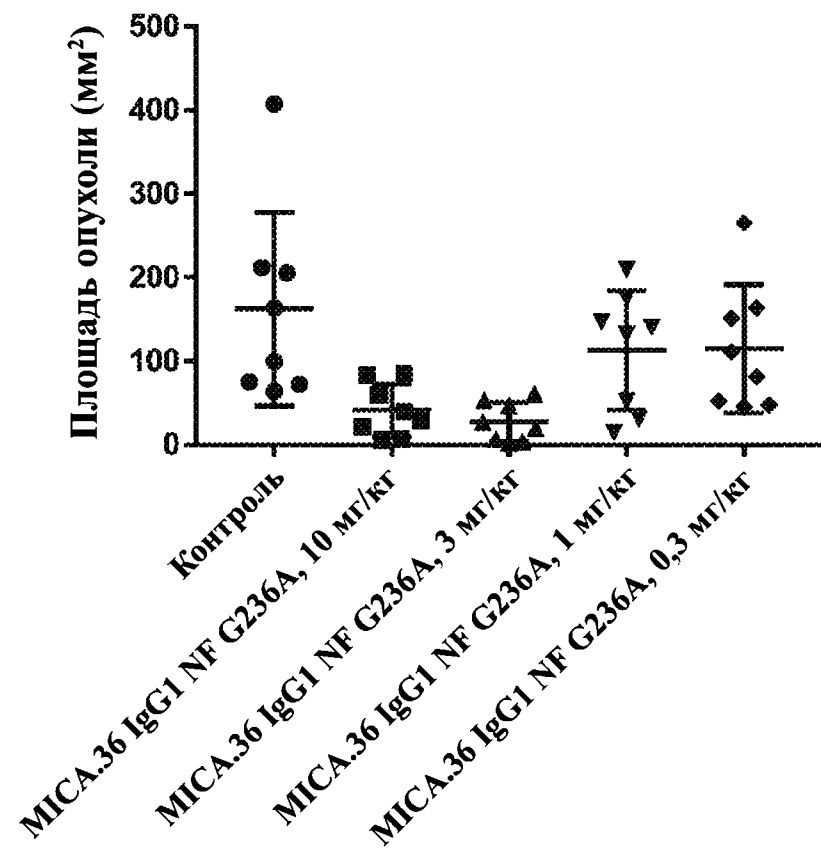
- MICA36 IgG1
- MICA36 IgG1 NF
- MICA36 IgG1 G236A
- MICA.36 IgG1 NF G236A
- Изотипический контроль



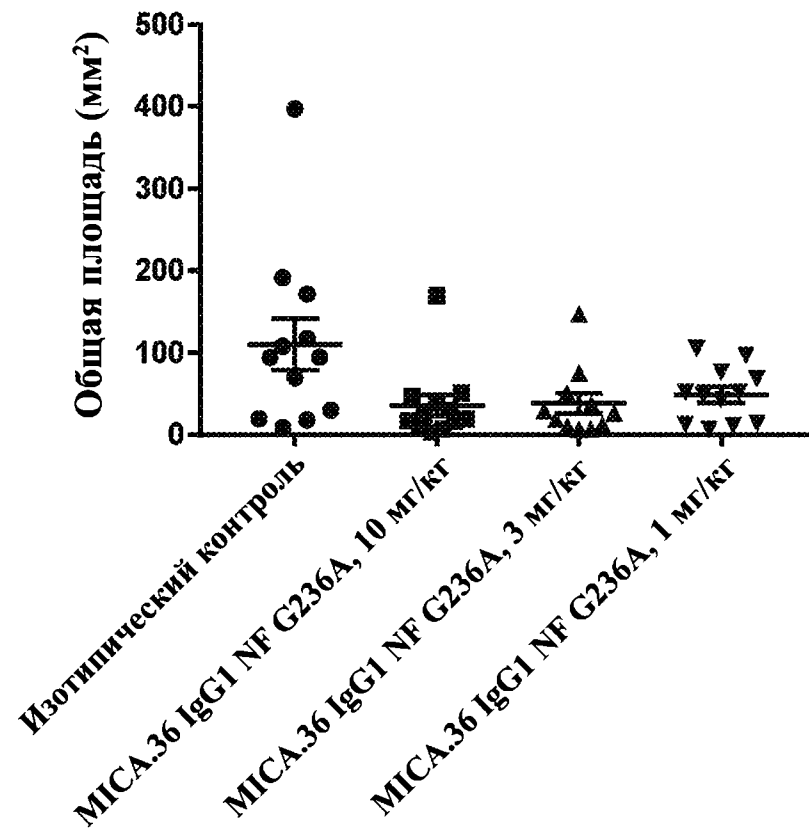
Фиг. 17А



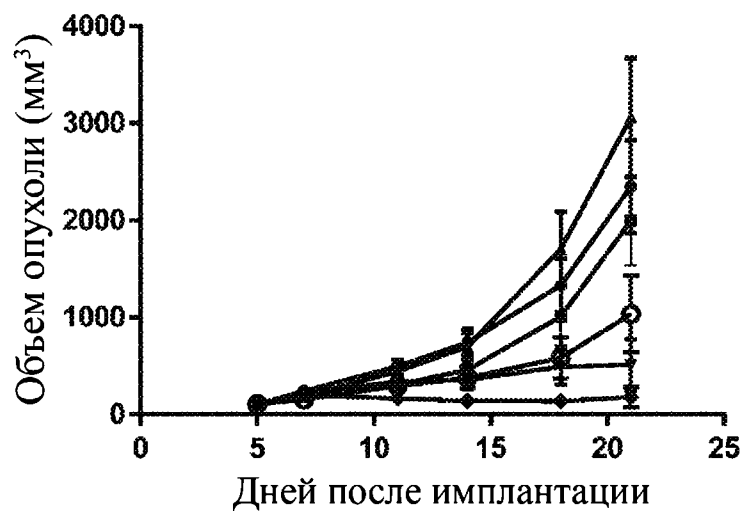
Фиг. 17В



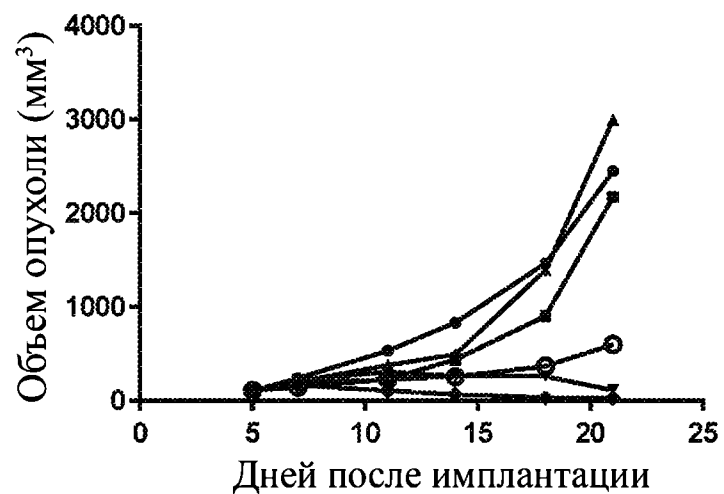
Фиг. 18А



Фиг. 18В

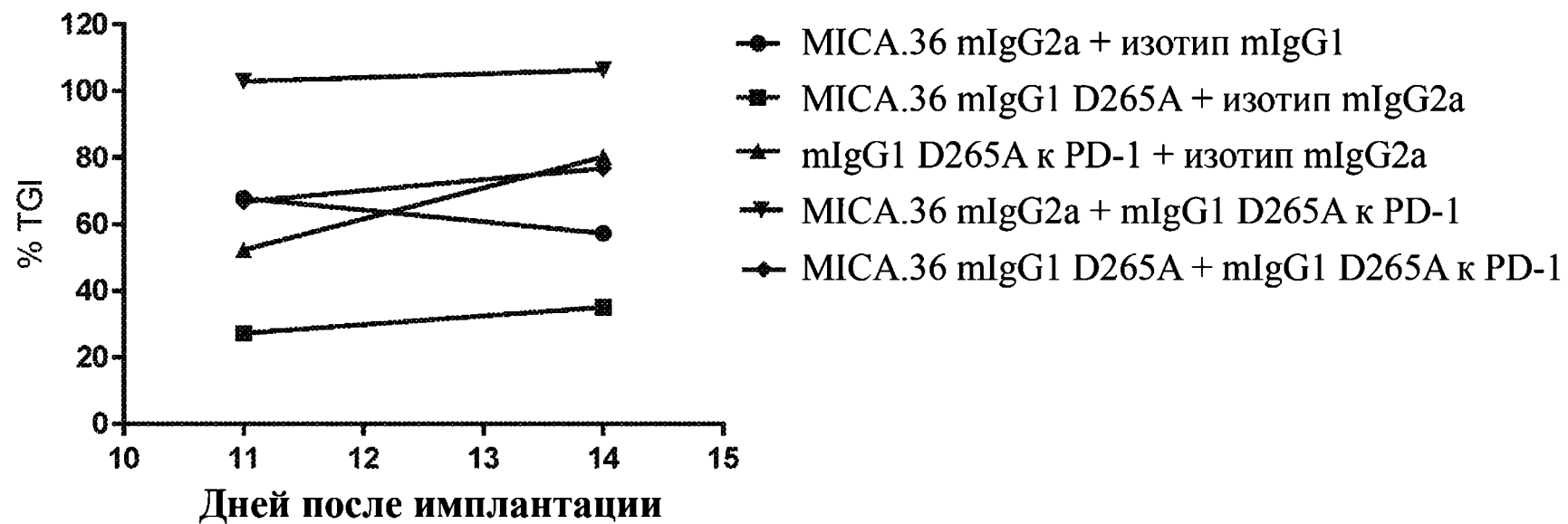


Фиг. 19А

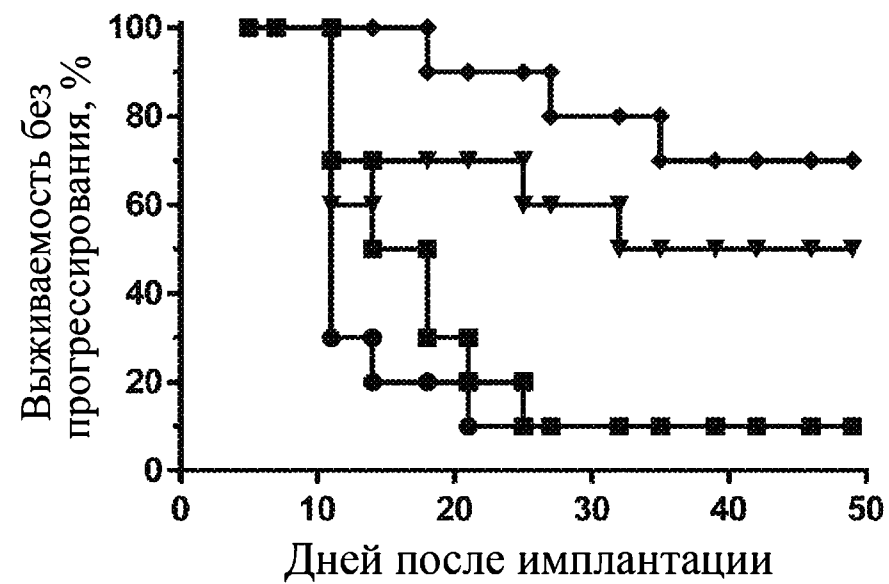


Фиг. 19В

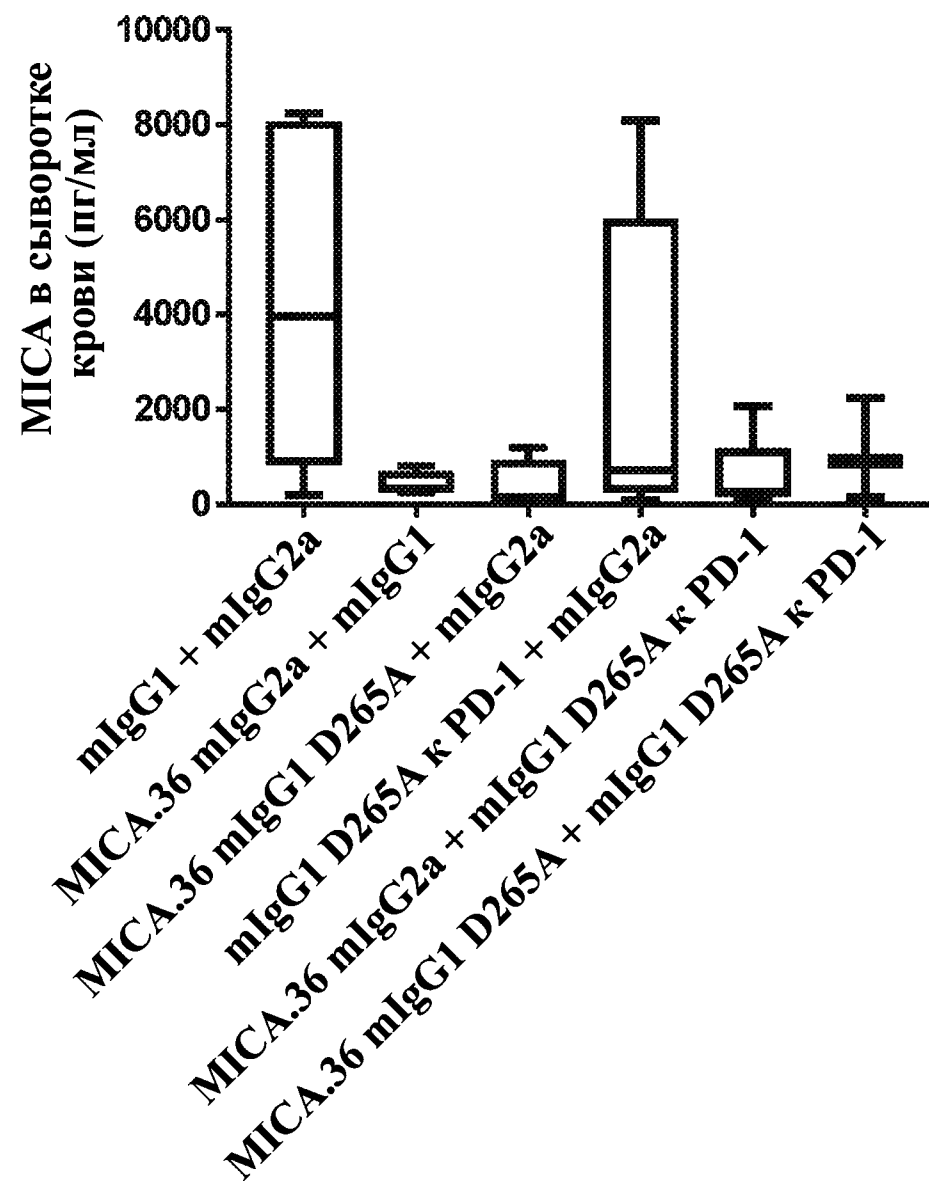
- Изотип mIgG1 + изотип mIgG2a
- MICA.36 mIgG2a + изотип mIgG1
- ▲— MICA.36 mIgG1 D265A + изотип mIgG2a
- ▼— mIgG1 D265A к PD-1 + изотип mIgG2a
- ◆— MICA.36 mIgG2a + mIgG1 D265A к PD-1
- MICA.36 mIgG1 D265A + mIgG1 D265A к PD-1



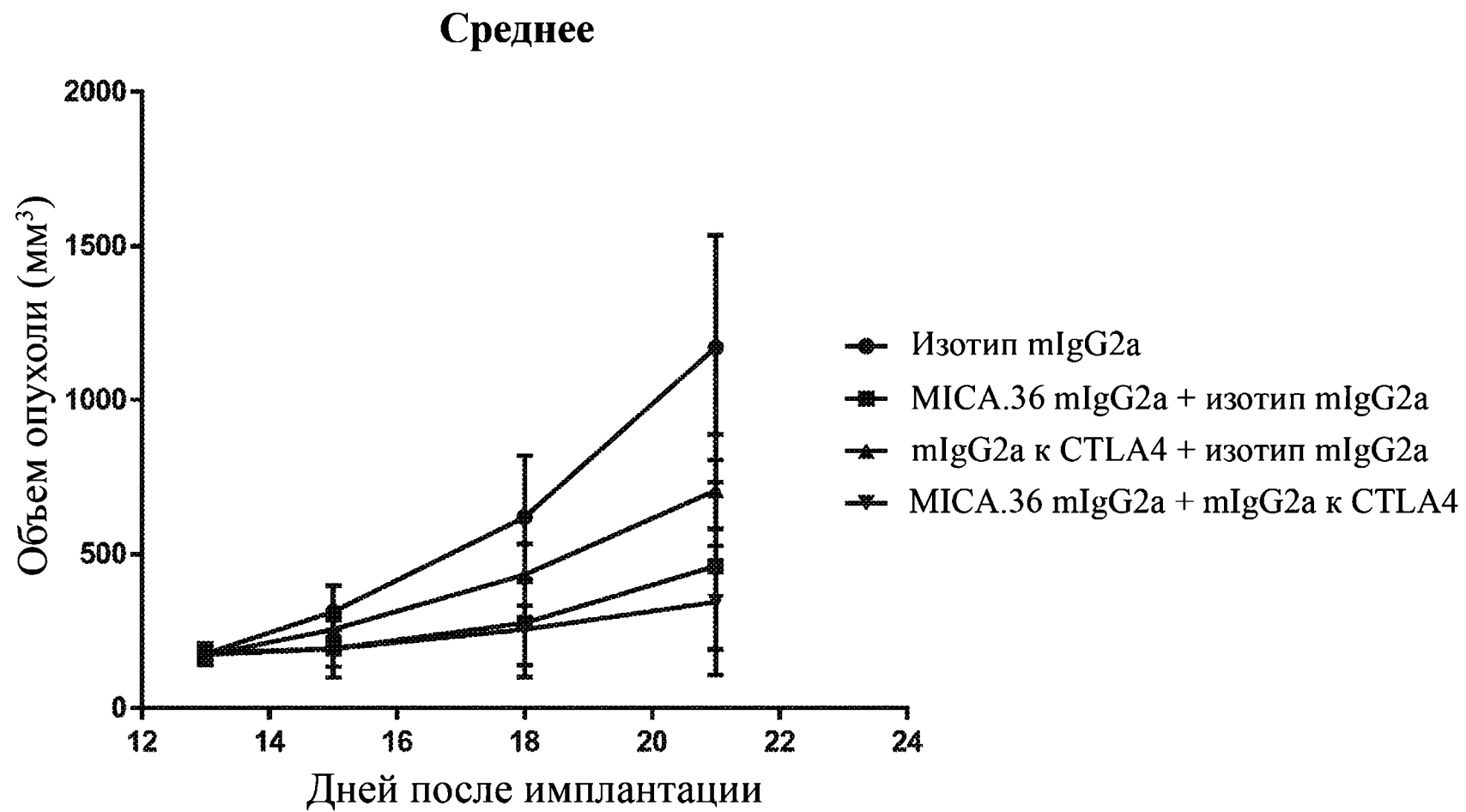
Фиг. 19С



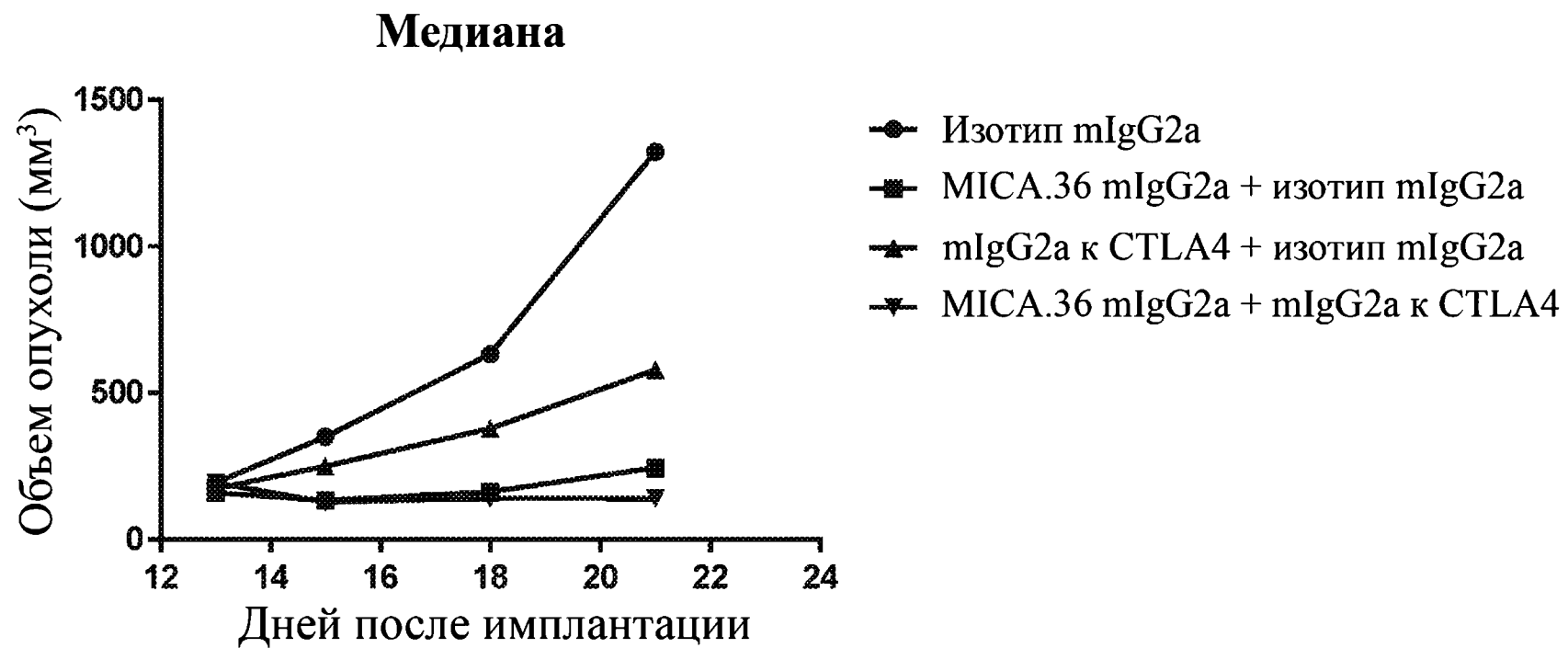
Фиг. 19D



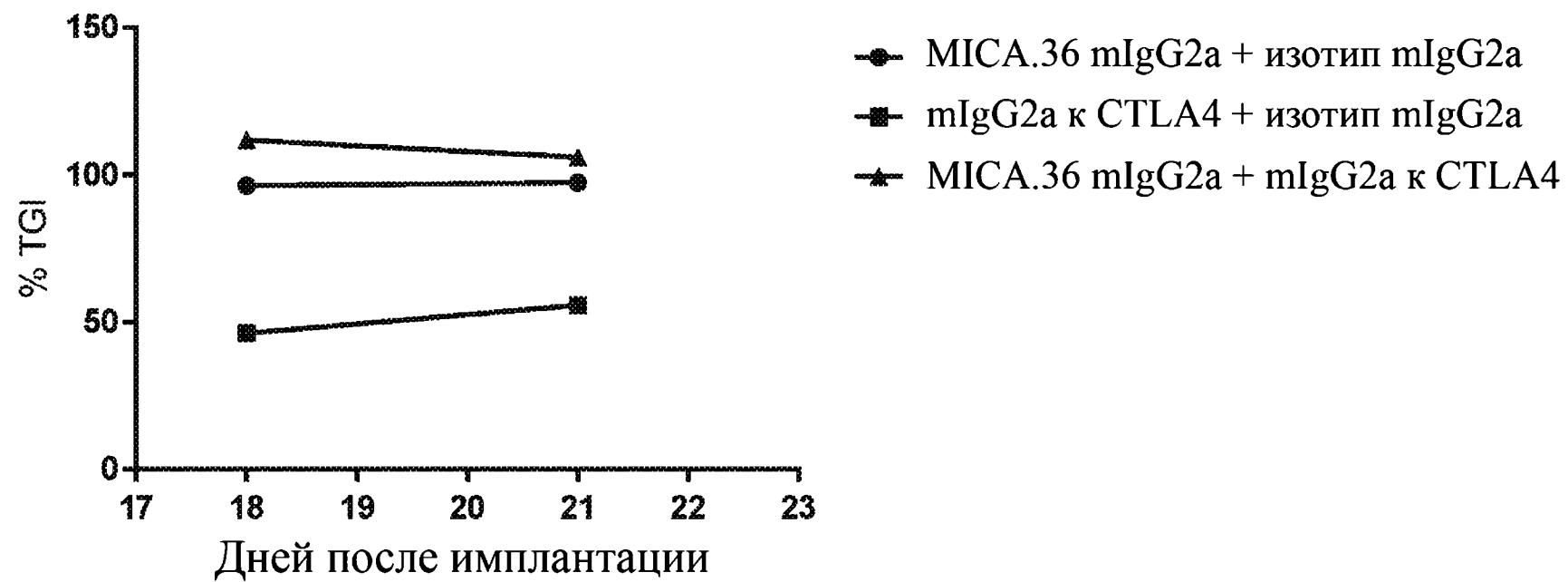
Фиг. 19Е



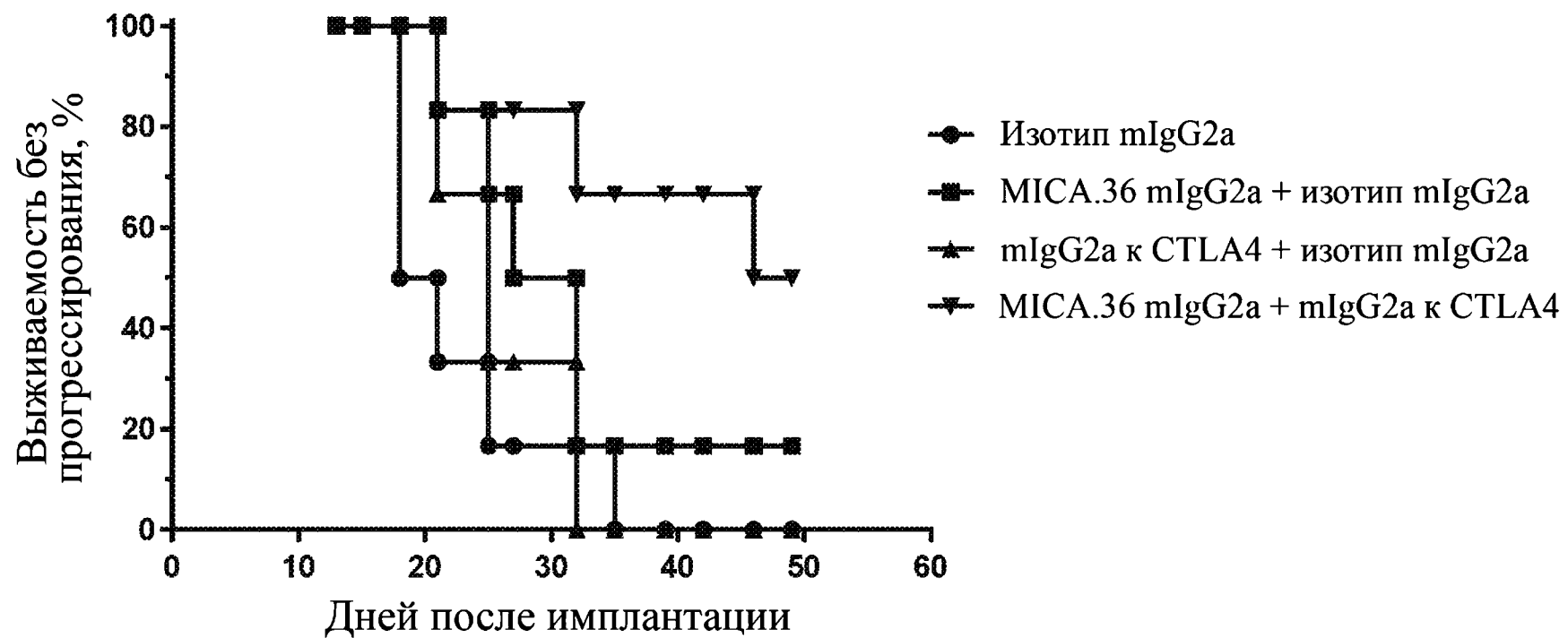
Фиг. 20А



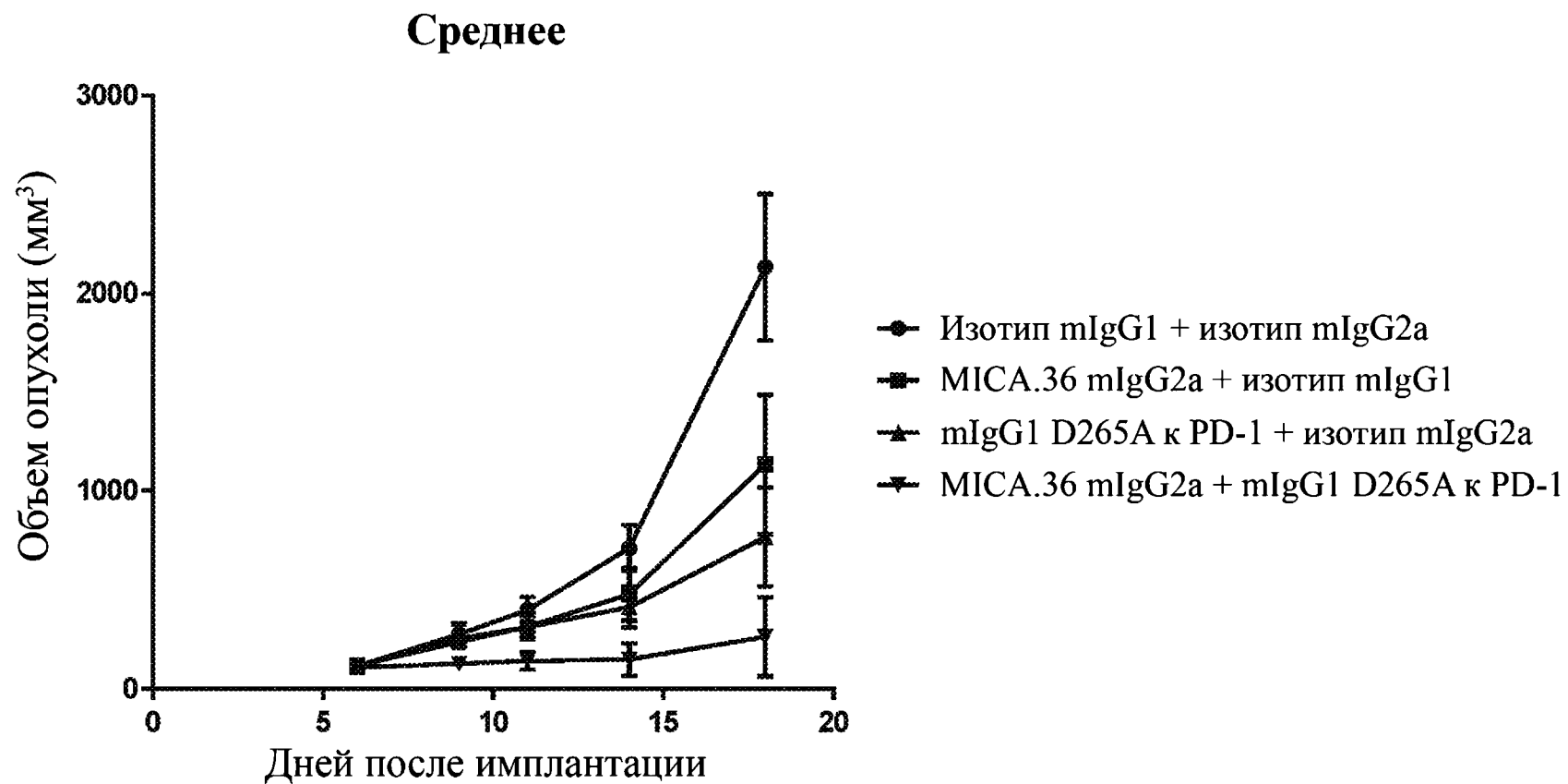
Фиг. 20В



Фиг. 20С

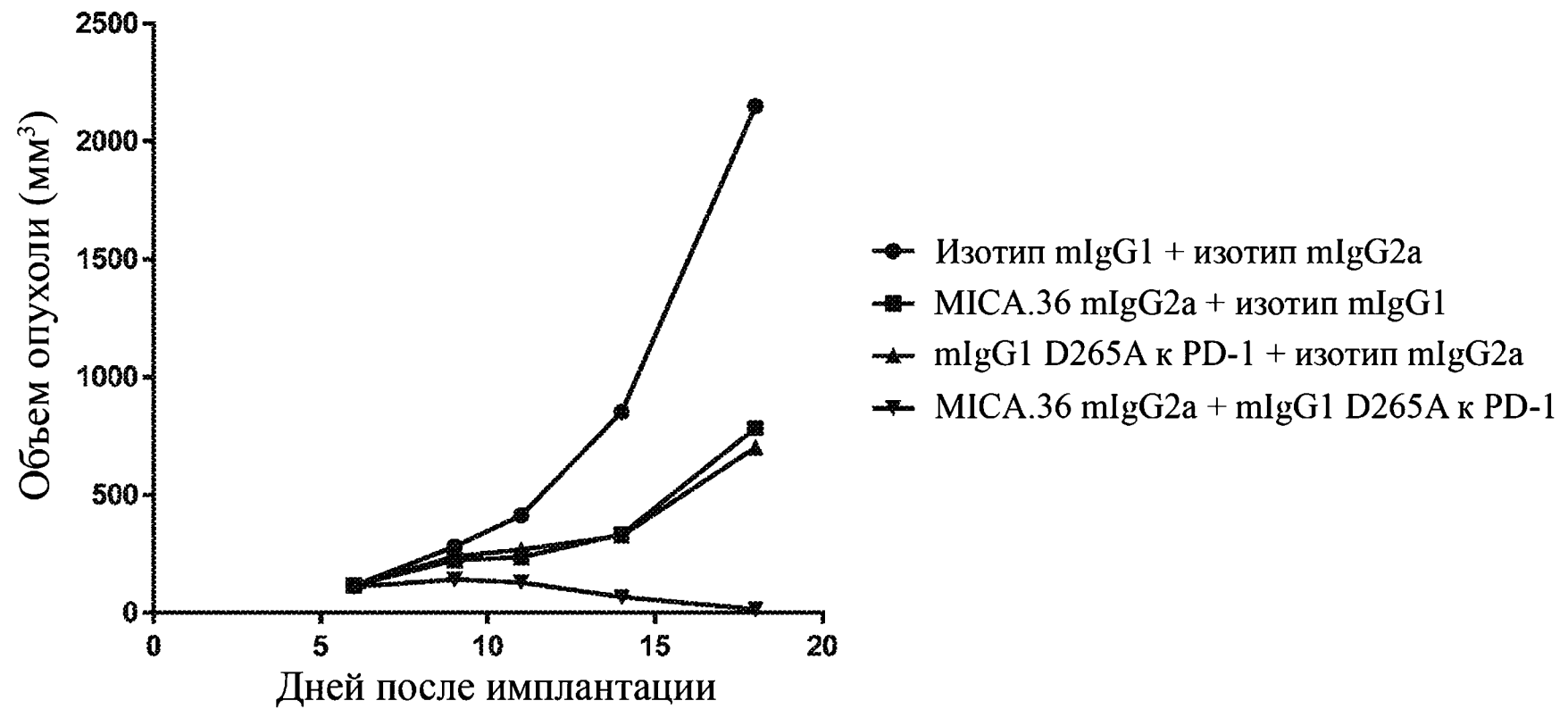


Фиг. 20D

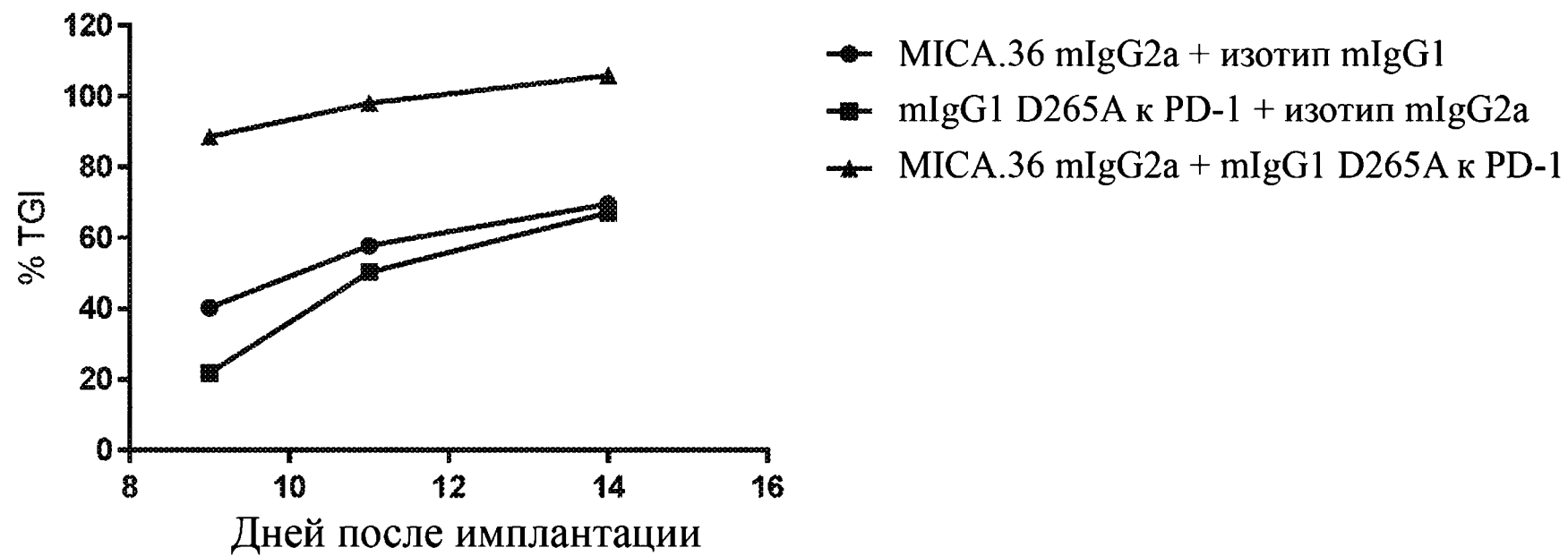


Фиг. 21А

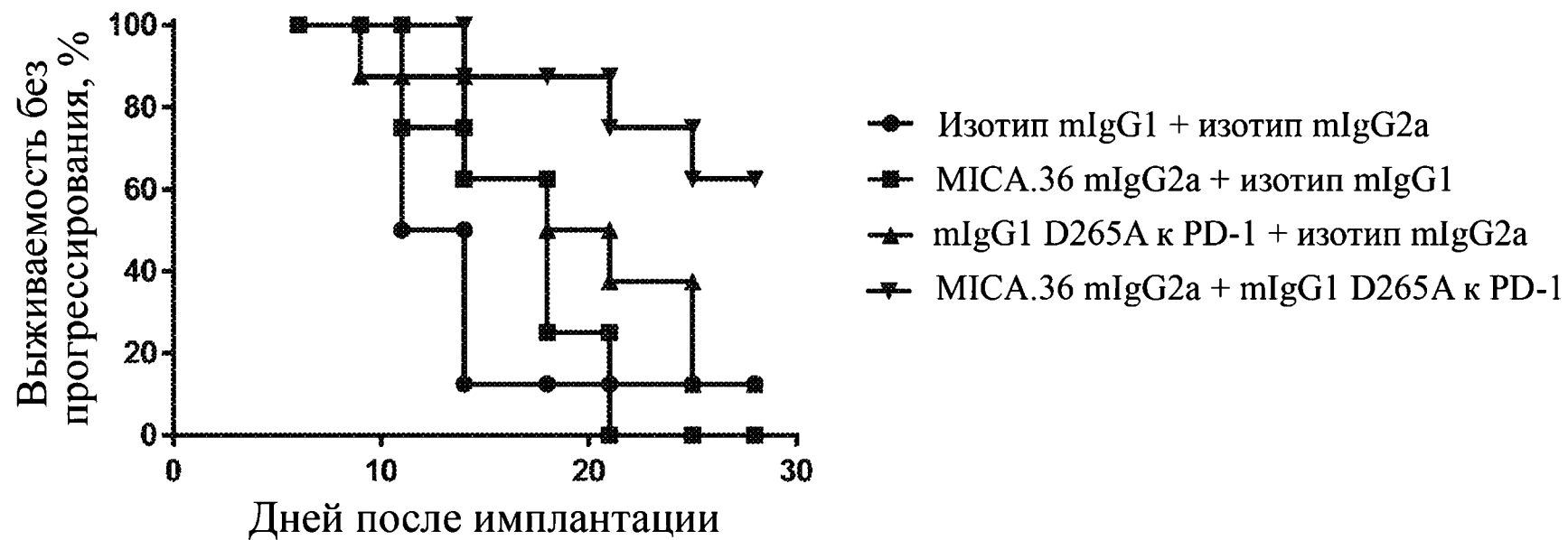
Медиана



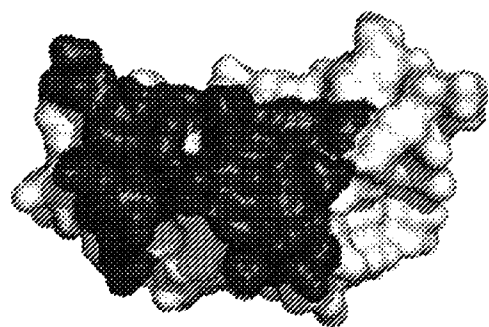
Фиг. 21В



Фиг. 21С



Фиг. 21D



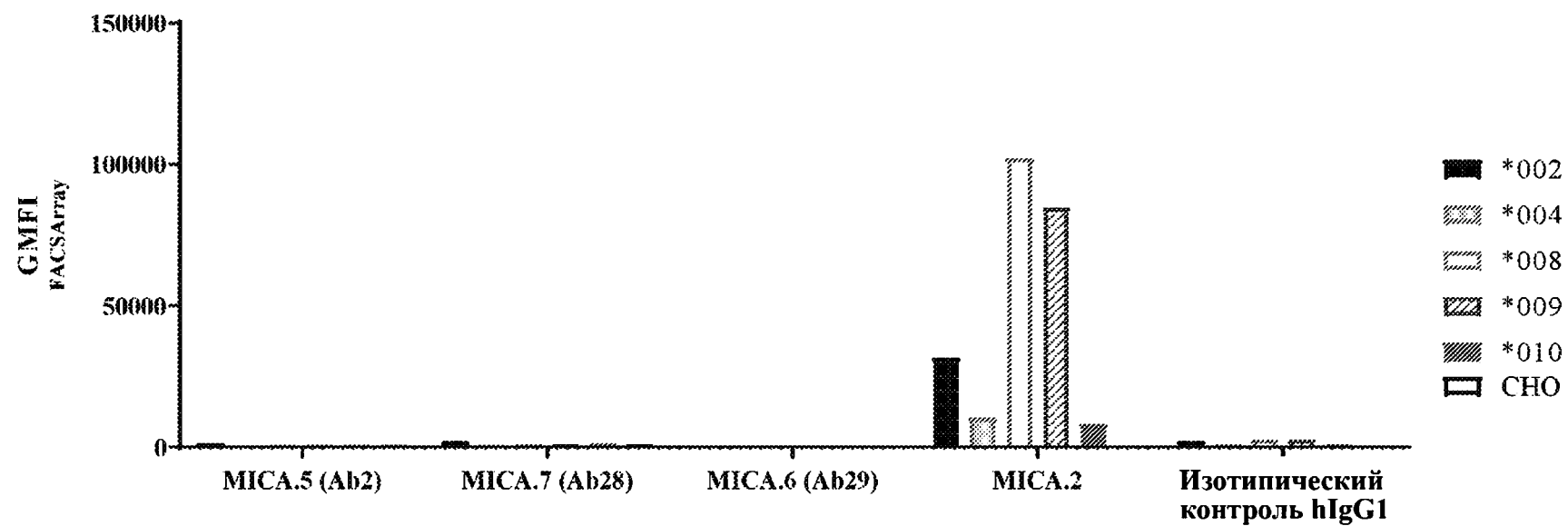
Фиг. 22А



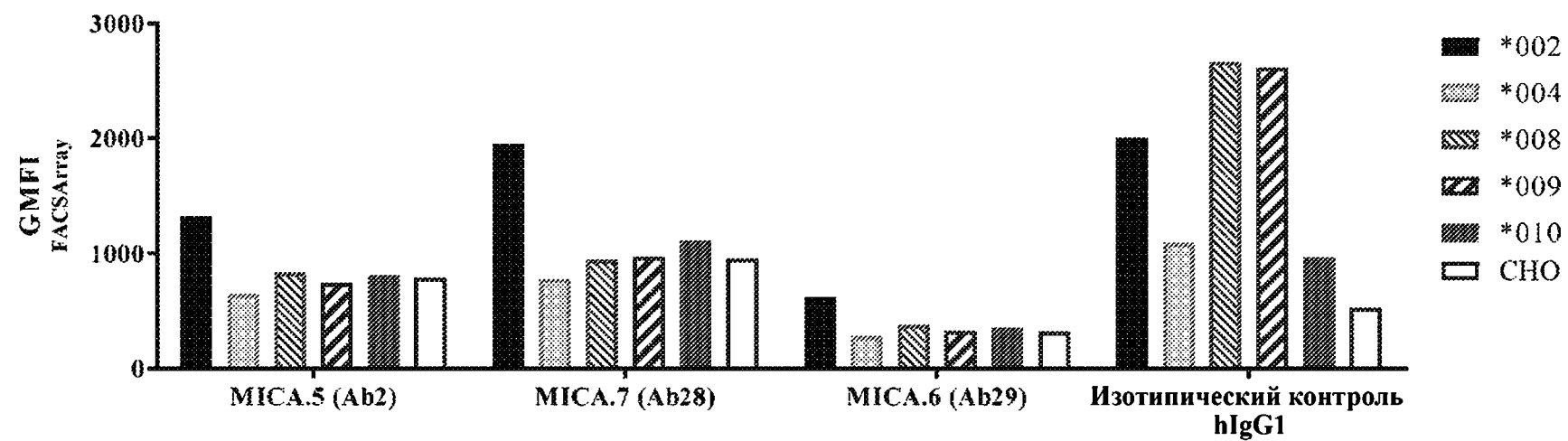
Фиг. 22В



Фиг. 22С

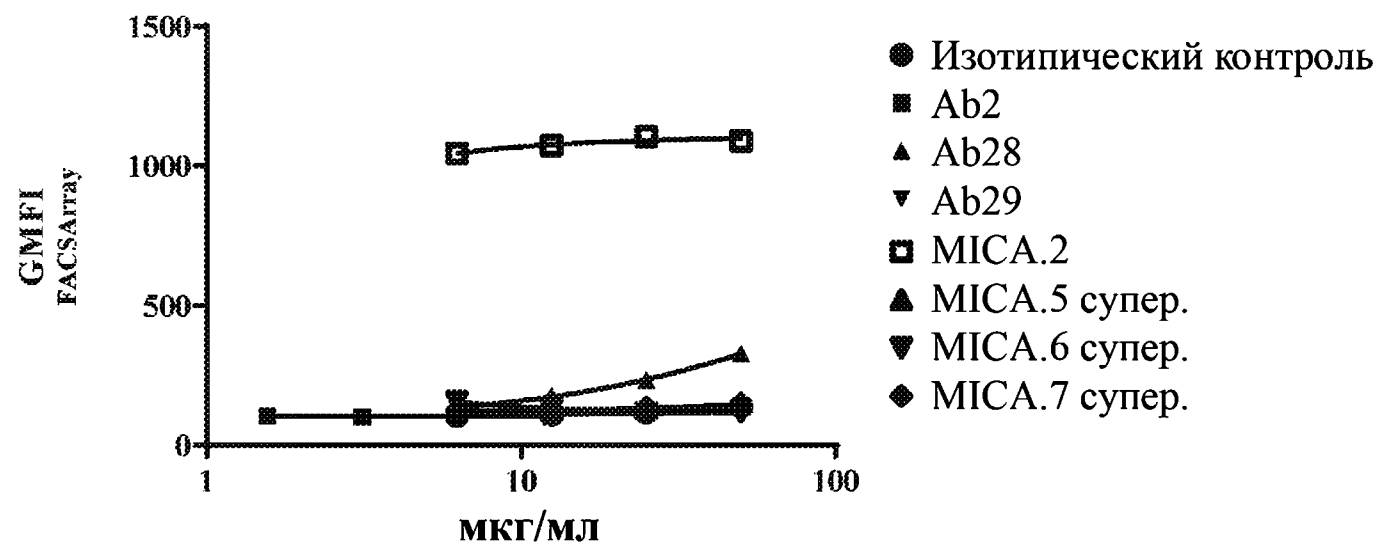


Фиг. 23А

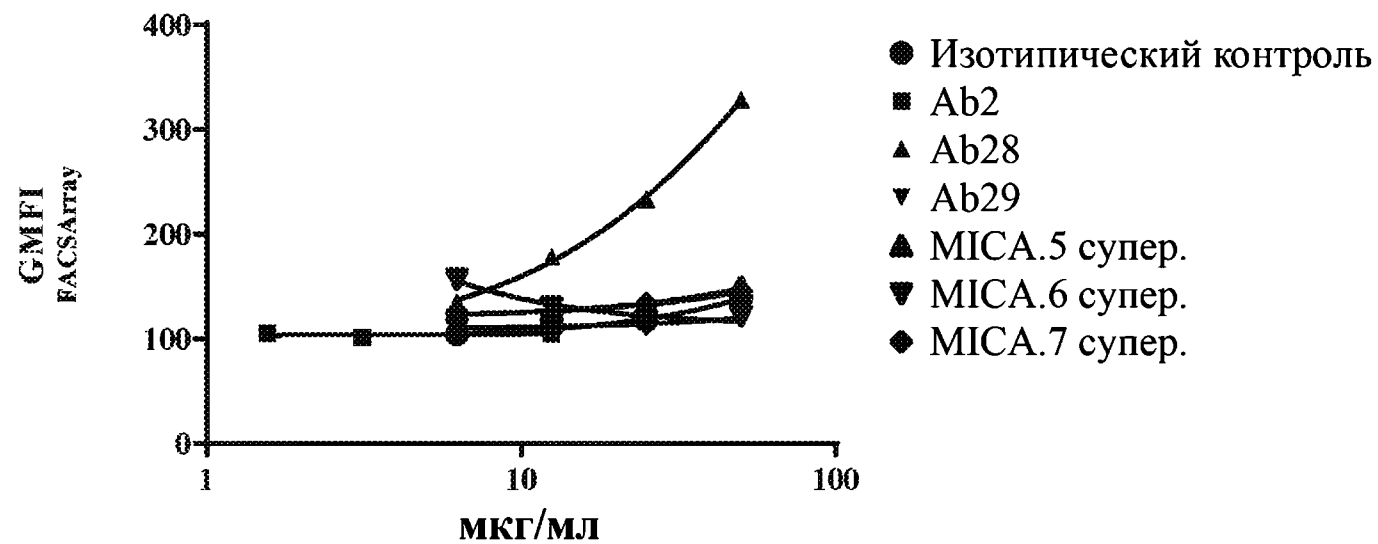


Фиг. 23В

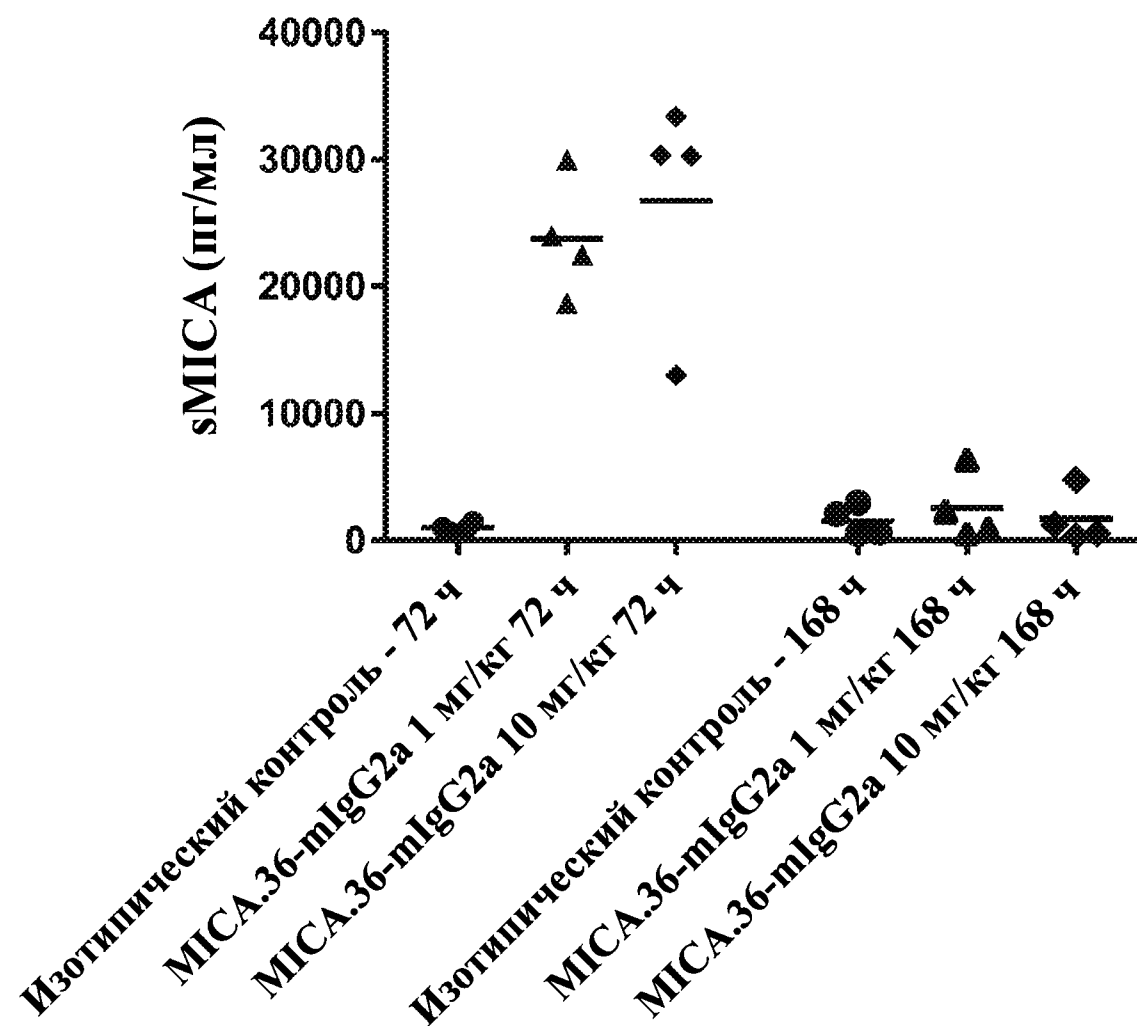
Фиг. 24А



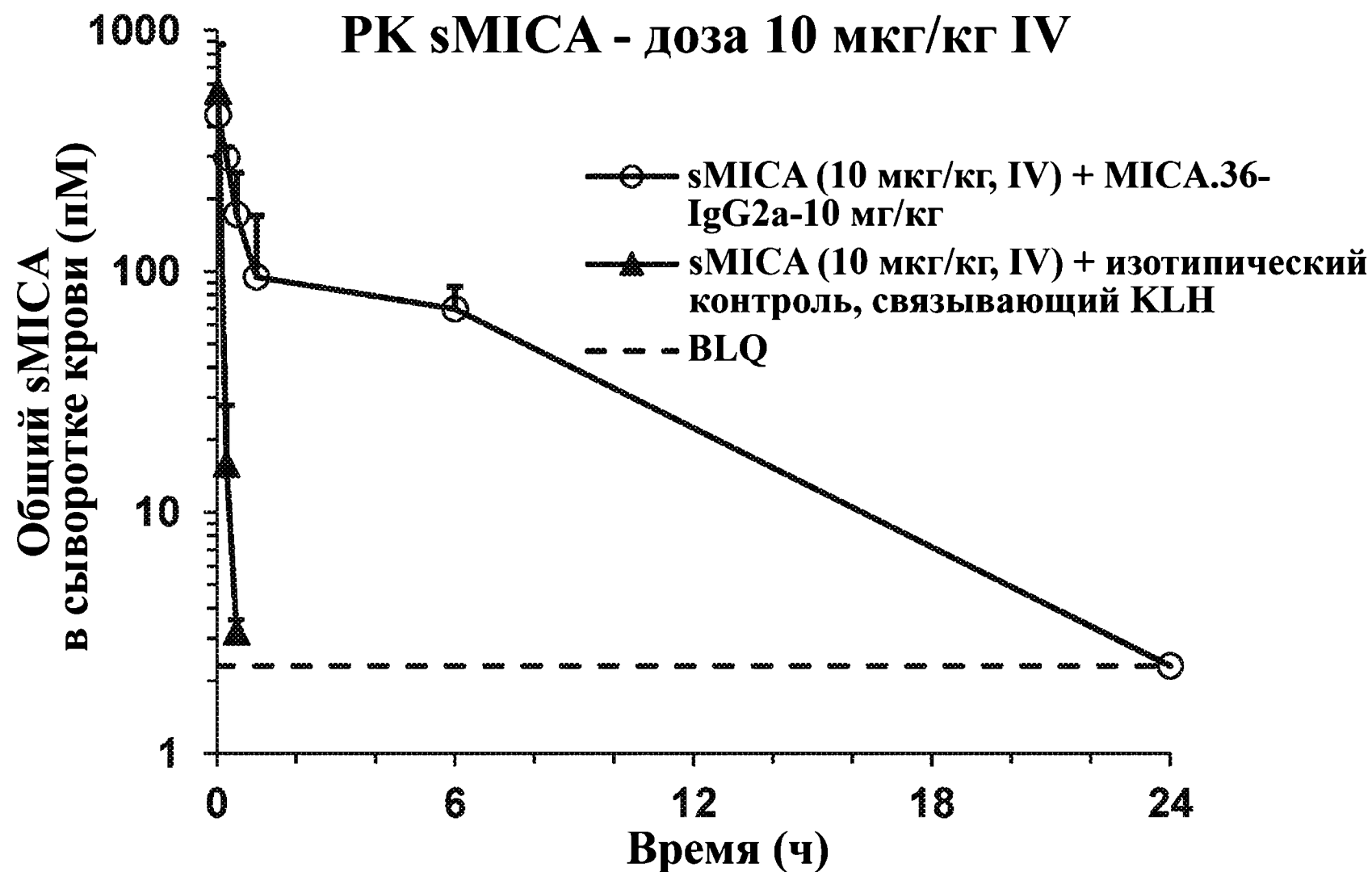
Фиг. 24В



Клинический MSD-анализ



Фиг. 25



Фиг. 26