(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191367 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.15

(22) Дата подачи заявки
2019.11.14

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

(54) АНТИТЕЛА К NKG2A И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/768,471; 62/927,211**
(32) **2018.11.16; 2019.10.29**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/061429**
(87) **WO 2020/102501 2020.05.22**

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

(72) Изобретатель:
Безман Натали, Корман Алан Дж., Дешпанд Ширкант, Джхатакиа Эми Д., Хуанг Ричард И., Чен Гуодонг, Рейкстро Джинджер С., Хеннинг Карла Энн, Ранган Вангипурам С., Би Кристин, Шао Сян (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В., Гизатуллина Е.М., Парамонова К.В. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенным моноклональным антителам (например, гуманизированным и человеческим моноклональным антителам) или их антигенсвязывающим фрагментам, которые с высокой аффинностью специфически связываются с белком ингибирующего рецептора клеток-натуральных киллеров группы 2A (NKG2A) человека и характеризуются терапевтически необходимыми функциональными свойствами, такими как для лечения, например, рака. Также настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, биспецифическим молекулам и фармацевтическим композициям, содержащим антитела к NKG2A по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие антитела, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам и к способам лечения, например, рака с применением таких антител. Также настоящее изобретение относится к комбинированной терапии, при которой антитело к NKG2A по настоящему изобретению совместно вводят по меньшей мере с одним дополнительным средством, таким как другое антитело (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и/или антитело к CTLA-4).

202191367 A1

202191367 A1

АНТИТЕЛА К NKG2A И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Ссылки на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество приоритета в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/768471, поданной 16 ноября 2018 года, и предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/927211, поданной 29 октября 2019 года, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам к NKG2A (ингибирующему рецептору клеток-натуральных киллеров группы 2A) и содержащих их фармацевтическим композициям. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких антител, в том числе к способам лечения таких заболеваний, как рак, путем введения антител к NKG2A и содержащих их фармацевтических композиций.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде через efs-web

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 4 ноября 2019 года, имеет название 13119-WO-PCT_SL.txt и размер 273467 байт.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Рак является глобальной эпидемией. Согласно данным Global Health Data Exchange, рак является одной из основных причин заболеваний и второй по значимости причиной смерти, являясь причиной приблизительно 17% смертей во всем мире. (“Hannah Ritchie and Max Roser, “Causes of Death – Share of deaths by cause, World, 2017”, OurWorldInData.org, 2018, доступна по ссылке: https://ourworldindata.org/grapher/share-of-deaths-by-cause-2016). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, даже в 2010 году экономический ущерб от рака составлял 1,16 триллиона долларов; по оценкам, в 2018 году от рака во всем мире умерло оценочно 9,6 миллиона человек. (“Cancer.” *World Health Organization*. World Health

Organization, 2018, доступна по ссылке https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer). Согласно оценкам Национального института рака, в 2019 году у более 1,7 миллиона новых пациентов будет диагностирован рак, а в Соединенных Штатах от рака умрут более 600000 пациентов. ("Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site." SEER Training Modules, U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2019 <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>).

К традиционным способам противоракового лечения относятся хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия, а также другие виды терапии. В последние годы иммуноонкология или иммунотерапия стали новым вариантом противоракового лечения с помощью иммунной системы организма. Иммуноонкология отличается от традиционных способов противоракового лечения, которые, например, предусматривают попытку целенаправленного воздействия непосредственно на опухоли и/или нарушения кровоснабжения опухоли. Вместо этого иммуноонкология предусматривает использование собственной иммунной системы пациента, чтобы помочь восстановить или усилить противоопухолевый иммунный ответ у пациента. Без иммуноонкологического подхода собственные иммунные ответы пациента зачастую по разным причинам не могут предотвратить рост опухоли. Например, многие опухоли выработали специальные механизмы, позволяющие им уклоняться от иммунных ответов пациента. Опухолевые клетки также могут лишиться экспрессии антигенов, которые могут распознаваться иммунной системой пациента. В других случаях быстрый рост опухоли может даже подавить способность иммунной системы эффективно бороться с опухолью. (Abbas *et al.*, "Chap. 18: Immunity to Tumors", in Cellular and Molecular Immunology, 9th ed. Elsevier, Inc., (2018)). При исследовании того, как иммунная система влияет на развитие рака и как иммунную систему можно использовать для лечения рака, сталкиваются со сложными и многогранными задачами. Например, многие пациенты не отвечают на существующие способы иммуноонкологического лечения, а у некоторых развиваются механизмы устойчивости, такие как истощение Т-лимфоцитов — тот случай, когда Т-лимфоциты, особый тип лейкоцитов, более не могут должным образом выполнять свои функции. (Dempke *et al.*, *Eur. J. of Cancer*, 74: 55-72 (2017)).

У пациентов остается потребность в усовершенствованных способах лечения таких заболеваний, как рак, для улучшения традиционных способов терапии, в том числе доступных в настоящее время способов противораковой иммунотерапии. Существует огромная потребность в новых иммуноонкологических средствах, применяемых либо отдельно, либо в комбинации с существующими средствами, для улучшения ответов у пациентов и для преодоления лекарственной устойчивости.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится, согласно некоторым аспектам, к выделенным моноклональным антителам (например, гуманизированным и человеческим моноклональным антителам), которые связываются с белком NKG2A человека (SEQ ID NO: 1), т. е. к антителам к NKG2A, в том числе к антителам к hNKG2A, которые обладают требуемыми функциональными свойствами. Согласно одному аспекту к требуемым функциональным свойствам раскрываемых в настоящем документе антител к NKG2A относится стимуляция иммунных ответов, например, для лечения рака. Согласно другому аспекту к требуемым функциональным свойствам раскрываемых в настоящем документе антител к NKG2A относится лечение зараженных вирусом субъектов, в том числе пациентов-людей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с помощью раскрываемых в настоящем документе антител к NKG2A лечат инфекционные заболевания. Согласно другому аспекту с помощью раскрываемых в настоящем документе антител к NKG2A лечат аутоиммунные патологические состояния. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела к NKG2A по настоящему изобретению применяют в качестве антагонистических антител к NKG2A для стимуляции и/или усиления иммунного ответа у субъекта, например, для стимуляции и/или усиления противоопухолевых ответов иммунной системы, в том числе клеток-натуральных киллеров и/или Т-клеток. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела к NKG2A по настоящему изобретению применяют в комбинации с другими антителами для лечения различных патологических состояний, в том числе рака, инфекционных заболеваний, в том числе вирусных инфекций, и аутоиммунных заболеваний. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые в настоящем документе антитела к NKG2A, либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами лечения, такими как иммуноонкологические средства лечения, и/или химиотерапия, и/или хирургия, применяют для лечения различных патологических состояний или заболеваний, в том числе рака и вирусных инфекций. В соответствии с другими вариантами осуществления раскрываемые в настоящем документе антитела к NKG2A применяют в способах детекции белка NKG2A в образце.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывают NKG2A человека и характеризуются по меньшей мере одним из следующих свойств:

(a) уменьшают (например, блокируют) связывание и/или взаимодействие лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека;

(b) обращают опосредованную NKG2A передачу ингибирующих сигналов;

(c) не связываются или связываются с низкой аффинностью с белком NKG2C человека;

(d) связываются с NKG2A человека и/или яванского макака;

(e) усиливают ответ клеток-натуральных киллеров;

(f) усиливают функциональную активность Т-клеток;

(g) обладают уменьшенным связыванием с человеческим Fc-гамма-рецептором (FcγR);

(h) индуцируют и/или усиливают противоопухолевый иммунный ответ;

(i) индуцируют и/или усиливают противовирусный иммунный ответ;

и/или

(j) обладают низкой иммуногенностью у субъектов, в том числе у людей.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают одним или несколькими из следующих свойств:

(a) характеризуются значением EC_{50} приблизительно 0,6 нМ или ниже для связывания с белком NKG2A человека, по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(b) характеризуются значением EC_{50} приблизительно 9,0 нМ или выше для связывания с белком NKG2C человека, по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(c) характеризуются значением EC_{50} для связывания с белком NKG2A человека, которое приблизительно в 15 раз меньше второго значения EC_{50} для связывания с белком NKG2C человека;

(d) характеризуются значением IC_{50} приблизительно 1,0 нМ или ниже для уменьшения связывания и/или взаимодействия с белком NKG2A человека, по результатам измерения с помощью анализа блокирования клеток;

(e) связываются с белком NKG2A человека с K_D приблизительно 0,4 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(f) связываются с NKG2A человека с K_D приблизительно 61 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(g) связываются с NKG2A яванского макака с K_D приблизительно 1,0 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(h) интернализируются при связывании с NKG2A-экспрессирующими клетками;

(i) увеличивают продуцирование гамма-интерферона (IFNγ);

(j) характеризуются интернализацией со значением EC_{50} приблизительно 0,5 нМ или ниже; и/или

(k) причем период полужизни комплекса антитело к NKG2A:NKG2A составляет приблизительно 40 секунд или дольше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления период полужизни комплекса антитело к NKG2A:NKG2A измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса.

В соответствии с одним вариантом осуществления раскрываемые в настоящем документе антитела к NKG2A или их антигенсвязывающий фрагмент уменьшают (например, блокируют) взаимодействие белка NKG2A человека и лиганда NKG2A человека (т. е. HLA-E).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, причем антитело содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11, 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, 14 и 15;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 154, 14 и 15; или

(c) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 155, 14 и 15.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком NKG2A человека и содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем

(a) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 167; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 164 или SEQ ID NO: 169 соответственно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, содержат вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, содержат вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, содержат вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 167, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 169.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, причем тяжелая и легкая цепи фактически состоят из:

(a) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 5 соответственно;

(b) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 19 соответственно; или

(c) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с белком NKG2A или связываются с тем же эпитопом, что и раскрываемые в настоящем документе антитела к NKG2A.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем при связывании с белком NKG2A человека антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS):

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158); и

(d) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления моноклональное антитело блокирует связывание лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые при связывании с NKG2A человека специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом HDX-MS и/или путем картирования эпитопов методом быстрого фотохимического окисления белков (FPOP):

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156)

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157)

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158)

(d) L; и

(e) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело блокирует связывание лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В соответствии с другими вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG1. В соответствии с другими вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела. В соответствии с другими вариантами осуществления фрагмент антитела представляет собой Fab-, Fab'-, (Fab')2-, Fv- или scFv-фрагмент. В соответствии с другими

вариантами осуществления выделенное моноклональное антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к выделенному, полноразмерному моноклональному антителу, которое специфически связывается с белком NKG2A человека, причем

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7, и/или

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления тяжелая цепь выделенного полноразмерного моноклонального антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

Согласно другому аспекту выделенное, полноразмерное моноклональное антитело специфически связываются с белком NKG2A человека, причем тяжелая цепь фактически состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7, а легкая цепь фактически состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 5.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельный участок тяжелой цепи и/или вариабельный участок легкой цепи описываемых в настоящем документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой комплементарную ДНК (кДНК).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему описываемые в настоящем документе молекулы нуклеиновой кислоты. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированной описываемым в настоящем документе вектором экспрессии.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, который содержит описываемые в настоящем документе антитела, связанные со средством.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам получения антитела, предусматривающим культивирование описываемой в настоящем документе клетки-хозяина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают выделение антитела из клетки-хозяина.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к биспецифической молекуле, содержащей описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A, связанные со вторым функциональным фрагментом.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A или описываемые в настоящем документе биспецифические молекулы и фармацевтически приемлемый носитель и/или растворимый нейтрально-активный гликопротеин гиалуронидазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство. В соответствии с другими вариантами осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и/или антитело к CTLA-4. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб, а антитело к CTLA представляет собой ипилимумаб. В соответствии с другими вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела предназначены для применения в качестве лекарственного препарата для лечения рака.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак, который лечат с применением описываемых в настоящем документе антител к NKG2A, иммуноконъюгатов, биспецифических молекул и композиций, представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому, рак эндометрия, рак шейки матки, рак ЖКТ, меланому, рак почки, рак уротелия, мультиформную глиобластому или связанный с вирусом рак. В соответствии с другими вариантами осуществления рак

представляет собой рак шейки матки, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого по типу аденокарциномы (NSCLC-AD), немелкоклеточный рак легкого по типу плоскоклеточного (NSCLC-SQC), рак ЖКТ, меланому, колоректальный рак (CRC), рак эндометрия, яичников, почечно-клеточную карциному (RCC), рак уротелия (UCC), молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, мультиформную глиобластому, рак предстательной железы (также известный как аденокарцинома предстательной железы или PRC) или неходжкинскую лимфому.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A предназначены для применения при усилении иммунного ответа. В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение относится к применению описываемых в настоящем документе антител к NKG2A при производстве лекарственного препарата для лечения рака.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам лечения или замедления прогрессирования рака у субъекта-человека, предусматривающим введение субъекту-человеку эффективного количества описываемых в настоящем документе антител к NKG2A, иммуноконъюгатов, биспецифических молекул или композиций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому, рак эндометрия, рак шейки матки, рак ЖКТ, меланому, рак почки, рак уротелия, мультиформную глиобластому или связанный с вирусом рак. В соответствии с другими вариантами осуществления рак представляет собой рак шейки матки, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого по типу аденокарциномы (NSCLC-AD), немелкоклеточный рак легкого по типу плоскоклеточного (NSCLC-SQC), рак ЖКТ, меланому, колоректальный рак (CRC), рак эндометрия, яичников, почечно-клеточную карциному (RCC), рак уротелия (UCC), молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, мультиформную глиобластому, рак предстательной железы (также известный как аденокарцинома предстательной железы или PRC) или неходжкинскую лимфому.

В соответствии с другими вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту-человеку одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой

химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство и/или иммунотерапевтическое средство. В соответствии с другими вариантами осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и/или антитело к CTLA-4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб, а антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа у субъекта-человека, предусматривающим введение субъекту-человеку эффективного количества описываемых в настоящем документе антител к NKG2A, биспецифических молекул или композиций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта-человека есть опухоль, и у него стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. В соответствии с другими вариантами осуществления у субъекта-человека есть хроническая вирусная инфекция, и у него стимулируют противовирусный иммунный ответ.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам детекции наличия белка NKG2A в образце, предусматривающим приведение образца в контакт с раскрываемым в настоящем документе антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые делают возможным образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и белком NKG2A, и детекцию образования комплекса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с белком NKG2A в 15 раз быстрее, чем с белком NKG2C.

Остальные признаки и преимущества настоящего изобретения будут понятны из последующего подробного описания и примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех литературных источников, записей в Genbank и других последовательностей, патентов и опубликованных заявок на выдачу патентов, которые упомянуты в настоящей заявке, однозначно включено в настоящий документ посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-C проиллюстрированы три способа, которые были использованы для поиска и тестирования раскрываемых в настоящем документе антител к NKG2A. На фиг. 1A проиллюстрирован гибридомный способ и стадии поиска и разработки антитела к NKG2A на высоком уровне. На фиг. 1B проиллюстрирован способ создания библиотеки

антител для поиска антитела. На фиг. 1C проиллюстрирован способ клонирования отдельных B-клеток (SBCC).

На фиг. 2 проиллюстрирован анализ методом мутационного сканирования, применяемый для оптимизации найденных антител к NKG2A. В частности, на фиг. 2 показаны стадии создания вариантов антитела 13F3.A4 I107T и определения его характеристик связывания с белком NKG2A. Данный анализ позволил авторам настоящего изобретения создать варианты антитела 13F3.A4 I107T с улучшенными свойствами и получить богатый набор информации о влиянии аминокислотных замен на связывание антитела 13F3.A4 I107T с белком NKG2A. На фиг. 2 раскрыты последовательности под SEQ ID NO: 183-190 соответственно в порядке их появления сверху вниз.

На фиг. 3 представлена иллюстративная тепловая карта, которая была получена с помощью анализа методом мутационного сканирования и которая позволяет интерпретировать взаимосвязь последовательность-активность у одиночных аминокислотных замен. На фиг. 3 раскрыты последовательности под SEQ ID NO: 191 (эмбрионального типа) и под SEQ ID NO: 192 (исходная). На фиг. 4 показаны положения CDR, которые были проанализированы для антитела 13F3.A4 I107T к NKG2A с использованием анализа методом мутационного сканирования. На фиг. 4 раскрыты последовательности под SEQ ID NO: 30, 15, 192, 11 и 193 соответственно в порядке их появления.

На фиг. 5A-E представлены тепловые карты, которые были получены с помощью анализа методом мутационного сканирования антитела 13F3.A4 I107T для замен в LCDR1 (SEQ ID NO: 194 и 30, эмбрионального типа и исходная соответственно) (фиг. 5A); замен в LCDR3 (SEQ ID NO: 195 и 15, эмбрионального типа и исходная соответственно) (фиг. 5B); замен в HCDR1 (SEQ ID NO: 196 и 192, эмбрионального типа и исходная соответственно) (фиг. 5C); замен в HCDR2 (SEQ ID NO: 42 и 11, эмбрионального типа и исходная соответственно) (фиг. 5D); и замен в HCDR3 (SEQ ID NOS: 193 и 193, эмбрионального типа и исходная соответственно) (фиг. 5E).

На фиг. 6 показаны результаты выравнивания канонических аминокислотных последовательностей полноразмерного NKG2A человека (SEQ ID NO: 182) и NKG2C человека (SEQ ID NO: 3). Приблизительно 76% аминокислотных остатков (177 из 233 аминокислотных остатков) являются консервативными, приблизительно 6% аминокислотных остатков (14 из 233 аминокислотных остатков) являются схожими, и лишь приблизительно 18% аминокислотных остатков (42 из 233 аминокислотных остатков) различаются у белков NKG2A человека и NKG2C человека.

На фиг. 7A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 166) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 167 без сигнальной последовательности) зрелого вариабельного участка тяжелой цепи (VH) антитела 13F3.A4 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 27), CDR2 VH (SEQ ID NO: 28) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 29) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 7B показаны нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 168) и аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 169) вариабельного участка легкой цепи антитела 13F3.A4. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 30), CDR2 VL (SEQ ID NO: 31) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 32) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 8A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 51) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 52) зрелого VH-участка антитела 2G6.C2 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 55), CDR2 VH (SEQ ID NO: 56) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 57) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 8B показаны нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 53) и аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 54) зрелого VL-участка антитела 2G6.C2 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 58), CDR2 VL (SEQ ID NO: 59) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 60) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 9A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 170) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 171) зрелого вариабельного (VH) участка тяжелой цепи антитела 11H9.A1 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 41), CDR2 VH (SEQ ID NO: 42) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 43) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 9B показаны нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 172) и аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 173) вариабельного участка легкой цепи зрелого антитела 11H9.A1 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 44), CDR2 VL (SEQ ID NO: 45) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 46) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 10A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 174) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 175) зрелого VH-участка антитела 4G5.D1 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 69), CDR2 VH (SEQ ID NO: 70) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 71) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 10B показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 176) и аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 177) VL антитела 4G5.D1. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 72), CDR2 VL (SEQ ID NO: 73) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 74) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 11A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 178) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 179) зрелого VH-участка антитела 1G5.B2 к NKG2A. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 83), CDR2 VH (SEQ ID NO: 84) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 85) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 11B показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 180) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 181) VL-участка антитела 1G5.B2. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 86), CDR2 VL (SEQ ID NO: 87) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 88) показаны в серых прямоугольниках.

На фиг. 12 показаны нарушения в аминокислотной последовательности, которые оценивали в антителе 13F3.A4. Указаны V, D и J производные эмбрионального типа. Слева показаны аминокислотные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи антитела 13F3.A4 (SEQ ID NO: 167), а справа показаны аминокислотные последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела 13F3.A4 (SEQ ID NO: 169). Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 30), CDR2 VL (SEQ ID NO: 31) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 32) показаны подчеркнутым. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 27), CDR2 VH (SEQ ID NO: 28) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 29) показаны подчеркнутым. Подвергаемые оценке нарушения в последовательностях обведены кружочком и отмечены.

На фиг. 13 показана полноразмерная аминокислотная последовательность антитела NKG2A.9 к NKG2A. Аминокислотная последовательность легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена под SEQ ID NO: 163 (показана с концевым лизином, который в другом варианте осуществления отсутствует). На фиг. 13 овалом обозначены две мутации, внесенные в последовательность VL (N30S) и последовательность VH (I107T) 13F3.A4 с получением последовательности NKG2A.9. Мотив N-гликозилирования показан пунктирным овалом. Три мутации (L234A, L235E и G273A), которые были внесены в Fc-участок, выделены жирным курсивом. Концевая аминокислота лизин в последовательности тяжелой цепи была удалена из зрелой последовательности. Аминокислотные последовательности CDR1 VL (SEQ ID NO: 13), CDR2 VL (SEQ ID NO: 14) и CDR3 VL (SEQ ID NO: 15) показаны жирным и подчеркнутым шрифтом. Аминокислотные последовательности CDR1 VH (SEQ ID NO: 10), CDR2 VH (SEQ ID NO: 11) и CDR3 VH (SEQ ID NO: 12) показаны жирным и подчеркнутым шрифтом.

На фиг. 14 показана полноразмерная аминокислотная последовательность антитела NKG2A.9 к NKG2A. Аминокислотная последовательность легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена под SEQ ID NO: 7.

На фиг. 15 показана полноразмерная аминокислотная последовательность антитела NKG2A.11 к NKG2A. Аминокислотная последовательность легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 19, а аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена под SEQ ID NO: 7.

На фиг. 16 показан круговой график результатов группирования эпитопов иллюстративных антител, полученных с помощью способа клонирования отдельных B-клеток (SBCC), и показано разнообразие данных антител. Линией соединены антитела, которые перекрестно блокируют друг друга. Представленные в качестве примера антитела, которые имеют схожий профиль блокировки в сравнению с эталонными антителами (13F3.A4, Z270, RD-ahNKG2a (клон 131411, кат. № MAB1059) и RD-ahCD94 (клон 131412, кат. № MAB1058)) совместно сгруппированы в группы 1-4, 6-7 и 9. Эталонные антитела с профилями блокировки, схожими с таковыми у представленных в качестве примера групп антител, также сгруппированы в группы 5, 8 и 10.

На фиг. 17A показан способ анализа для оценки способности антител к NKG2A человека, полученных с помощью способа SBCC, блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E. На фиг. 17 B видно, что представленные в качестве примера антитела блокировали лишь частично или вовсе не блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E в сравнении с положительным контролем (антителом NKG2A.9) и отрицательным контролем (изотипическим контролем).

На фиг. 18A-C показан способ анализа связывания (фиг. 18A), и полученные результаты, для оценки связывания антител к NKG2A с экспрессирующими NK2GA человека (фиг. 18B) и экспрессирующими NKG2C клетками CHO (фиг. 18C). Как можно видеть на фиг. 18B, антитела 13F3.A4, 11H9.A1 и 2EB.B1 характеризовались специфическим связыванием с экспрессирующими NKG2A человека клетками CHO. На фиг. 18D-F показан способ анализа блокировки (фиг. 18D), и полученные результаты, использованный для оценки блокировки антителами к NKG2A взаимодействия NKG2A/HLA-E (фиг. 18E) и взаимодействия NKG2C/HLA-E (фиг. 18F). Антитела 13F3.A4 и 11H9.A1 характеризовались специфическим связыванием с экспрессирующими NKG2A человека клетками CHO (как видно на фиг. 18E) и не блокировали взаимодействие NKG2C/HLA-E (как видно на фиг. 18F).

На фиг. 19A-B проиллюстрирован использованный способ анализа связывания (фиг. 19A), и полученные результаты, с помощью которого оценивали способность антител к NKG2A связываться с линией положительных по NKG2A человека клеток-натуральных киллеров (NKL) (как видно на фиг. 19B). На фиг. 19C-D проиллюстрирован использованный способ анализа блокировки (фиг. 19C) и полученные результаты, из

которых видно, что протестированные антитела к NKG2A блокировали связывание HLA-E с экспрессирующими NKG2A человека NKL-клетками, как видно на фиг. 19D.

На фиг. 20A-C проиллюстрирован использованный способ анализа блокировки (фиг. 20A) и полученные результаты, из которых видно, что протестированные антитела к NKG2A человека блокировали взаимодействие белок слияния NNKG2A/HLA-E у hNKG2A-экспрессирующих клеток CHO, как видно на фиг. 20B-C.

На фиг. 21A-C проиллюстрирован использованный способ анализа связывания (фиг. 21A) и полученные результаты, из которых видно, что протестированные антитела к NKG2A связывались с экспрессирующими NKG2A человека клетками CHO, как видно на фиг. 21B-C.

На фиг. 22A-C проиллюстрирован использованный способ анализа связывания (фиг. 22A), и полученные результаты, с помощью которого оценивали способность антител к NKG2A связываться с экспрессирующими NKG2A яванского макака клетками CHO (результаты представлены на фиг. 22B-C).

На фиг. 23A-B проиллюстрирован способ анализа блокировки (фиг. 23A), и полученные результаты, использованный для оценки способности антител к NKG2A предпочтительно блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E (фиг. 23B). На фиг. 23C-D показан использованный способ анализа связывания (фиг. 23C) и полученные результаты, из которых видна способность антител к NKG2A связываться с NKG2A-экспрессирующими клетками CHO (фиг. 23D).

На фиг. 24A-B показан способ анализа связывания (фиг. 24A), и полученные результаты, использованный для оценки, связываются ли антитела к NKG2A с положительными по NKG2A яванского макака NKL-клетками (фиг. 24B). Как видно на фиг. 24B, антитела 11H9.A1 и 4G5.D1 не связывались с положительными по NKG2A яванского макака NK-клетками, тогда как антитело 13F3.A4 предпочтительно связывалось с положительными по NKG2A яванского макака NK-клетками, что видно по значению EC_{50}, которое равно 0,2 нМ.

На фиг. 25A проиллюстрирован *in vitro* способ, использованный для оценки того, увеличивали ли антитела к NKGA дегрануляцию NK-клеток. На фиг. 25B-C представлены графики результатов анализа проточной цитометрией и видно, что все протестированные антитела к NKG2A (антитела NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5, 2G6.C2 и 4G5.D1) усиливали дегрануляцию NK-клеток (измеренную как кратное изменение % CD107a по сравнению с изотипическим контролем) среди NKG2A+ NK-клеток. Клон 25E7.G8 (показанный на фиг. 25B) представляет собой неблокирующее антитело, которое использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 26A проиллюстрированы *in vitro* эксперименты с использованием NKL-клеток и CHO/MICA/HLA-E для демонстрации того, что антитела к NKG2A блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E среди активированных NK-клеток и увеличивали продуцирование IFN-γ. На фиг. 26B показано, что антитела 13F3.A4, 11H9.A1 и 4G5.D1 предпочтительно увеличивали продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем (человеческим антителом IgG1.3). В качестве отрицательного контроля использовали клон 25E7.G8.

На фиг. 27A проиллюстрированы *in vitro* эксперименты, использованные для оценки того, усиливали ли антитела к NKG2A ответ с участием CD8+ Т-клеток и с повышенной выработкой IFNγ на целевые клетки Hs766T, линии клеток карциномы поджелудочной железы. На фиг. 27B представлено графическое изображение результатов анализа и показано, что антитела 13F3.A4 и 11H9.A1 увеличивали продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем. В качестве отрицательного контроля использовали клон 25E7.G8.

На фиг. 28A-B показаны результаты анализа методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX) mFc-hNKG2A-hCD94 при взаимодействии с антителом NKG2A.9 (фиг. 28A) и с антителом 13F3.A4 (фиг. 28B) соответственно. Последовательности эпитопа обозначены на фиг. 28A-B (SEQ ID NO: 119-122, раскрыты слева направо в ходе анализа).

На фиг. 29A-B показаны полученные с помощью FPOP процентные значения защиты для четырех остатков (M163, F179, H184, L206) в hNKG2A при взаимодействии с антителом NKG2A.9 (фиг. 29A) и с антителом 13F3.A4 (фиг. 29B) соответственно.

На фиг. 30 показаны эпитопы антител NKG2A.9 и 13F3.A4 по результатам определения с помощью HDX-MS и FPOP при картировании относительно последовательности mFc-hNKG2A-hCD94 (SEQ ID NO: 125). Эпитопы, выделенные жирным и подчеркнутым шрифтом, были определены с помощью HDX-MS, а эпитопы, выделенные кружком, были определены с помощью FPOP-анализа.

На фиг. 31 показан эпитоп антитела к NKG2A (например, у антител NKG2A.9 и 13F3.A4), визуализированный на кристаллической структуре NKG2A/CD94/HLA-E. Эпитоп антитела к NKG2A показан черным цветом.

На фиг. 32A-B показаны результаты выравнивания VH-участков (SEQ ID NO: 167, 8 и 8 соответственно в порядке появления сверху вниз) (фиг. 32A) и VL-участков (SEQ ID NO: 169, 9 и 164 соответственно в порядке появления сверху вниз) (фиг. 32B) определенных частей антител к NKG2A (13F3.A4, NKG2A.9 и NKG2A.11). Выравнивание привело к

обнаружению антител к NKG2A с консенсусными последовательностями CDR, показанными в рамках.

На фиг. 33 показаны результаты анализа, что антитело NKG2A.9, по сравнению с изотипическим контролем, обращало ингибирование передачи сигнала NK-κB у NKG2A-экспрессирующих Т-клеток Jurkat, простимулированных посредством CHO/scOKT3/HLA-E.

На фиг. 34A проиллюстрирован экспериментальный способ, использованный для анализа влияния антител NKG2A.9 и антител к PD-L1, либо по отдельности либо в комбинации, на индукцию посредством IFN-γ $NKG2A^+$ CD8+ Т-клеток, выделенных из здоровых мононуклеаров периферической крови (PBMC). На фиг. 34B показаны результаты реализации данного способа, из которых видно, что комбинация антител NKG2A.9 и антител к PD-L1 дозозависимым образом усиливала продуцирование IFN-γ $NKG2A^+$ CD8+ Т-клетками.

На фиг. 35A-B проиллюстрирован способ анализа (фиг. 35A), использованный для демонстрации того, что антитела NKG2A.9 и/или антитела к PD-L1 усиливали продуцирование IFN-γ у $NKG2A^+$ CD8+ Т-клеток, выделенных из человеческих опухолей, совместно культивируемых с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 (фиг. 35B).

На фиг. 36A представлен график, на котором видно, что антитело NKG2A.9 интернализировалось после связывания с NKG2A-экспрессирующими клетками. На фиг. 36B представлен график, на котором показана кинетика связывания антитела NKG2A.9 и продемонстрировано, что антитело NKG2A.9 интернализировалось дозозависимым образом с EC_{50} 0,5 нМ.

На фиг. 37A-B проиллюстрирован способ (фиг. 37A), использованный для демонстрации того, что антитело NKG2A.9, в сравнении с изотипическим контролем, увеличивало дегрануляцию NK-клеток дозозависимым образом, что было измерено по % экспрессии CD107a, измеряемой с помощью проточной цитометрии. На фиг. 37C-D проиллюстрирован использованный экспериментальный способ (фиг. 37C), из результатов которого было видно, что антитело NKG2A.9, в сравнении с изотипическим контролем, увеличивало лизис HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток дозозависимым образом (фиг. 37D).

На фиг. 38A проиллюстрирован способ, использованный для измерения влияния антитела 13F3.A4 на продуцирование IFN-γ у NKL-клеток, совместно культивируемых с CHO/MICA/HLA-E. На фиг. 38B показано, что антитело 13F3.A4 увеличивало продуцирование IFN-γ у NKL-клеток в сравнении с изотипическим контролем.

На фиг. 39 показаны результаты исследования по подбору доз, в которых 10 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг антитела к mNKG2A (NKG2A.3) вводили в виде монотерапии, и они ингибировали рост опухоли в модели опухоли карциномы толстой кишки с 48%, 56% и 30% уменьшением среднего объема опухоли соответственно. При дозе 0,3 мг/кг эффективности не наблюдали.

На фиг. 40A-E показаны результаты *in vivo* исследований, в которых антитела к mNKG2A и к mPD-1 уменьшали опухолевый рост на мышиных моделях, при этом монотерапия антителом к mNKG2A давала монотерапевтическую активность на мышиной модели колоректальной опухоли CT26. На фиг. 40A-D показан объем опухоли в различные моменты времени после имплантации опухоли мышам (n=10/группа), обработанным изотипическим контролем (фиг. 40A), только антителом к mNKG2A (фиг. 40B), только антителом к mPD-1 (фиг. 40C) или комбинацией антител к mNKG2A и антител к mPD1 (фиг. 40D). На фиг. 40E показан средний объем опухоли в зависимости от времени (суток после имплантации опухоли) у мышей, обработанных изотипическим контролем, только антителом к mNKG2A, только антителом к mPD-1 или комбинацией антител к mNKG2A и антител к mPD-1.

На фиг. 41A-C представлены графики, демонстрирующие результаты *in vivo* исследований, в которых антитела к NKG2A и антитела к PD-1 увеличивали цитотоксичность NK-клеток (фиг. 41A) и опухоль-специфических CD8+ T-клеток, а также уровень IFN-γ на мышиной модели карциномы толстой кишки (фиг. 41B-C).

На фиг. 42A-E показана противоопухолевая активность антител к mNKG2A и антител к mCTLA-4, либо отдельно, либо в комбинации, на мышиной модели саркомы 1956. На фиг. 42A-D показан объем опухоли в различные моменты времени после имплантации опухоли мышам, обработанным изотипическим контролем (фиг. 42A), антителом к mCTLA-4 (фиг. 42B, CTLA-4 IgG2a, 0,1 мг/кг), антителом к mNKG2A (фиг. 42C, 10 мг/кг) или комбинацией антител к mNKG2A и антител к mCTLA-4 (фиг. 42D). На фиг. 42E показан средний объем опухоли в зависимости от времени (суток после имплантации опухоли) у мышей, обработанных изотипическим контролем, только антителом к mCTLA-4, только антителом к mNKG2A или комбинацией антител к mNKG2A и антител к mCTLA-4.

На фиг. 43 показана противоопухолевая активность антител к NKG2A, антител к PD-1 и антител к LAG3 и их комбинаций на мышиной модели лимфомы. Введение отдельно антитела к NKG2A давало преимущество в выживании с 10% коэффициентом выживаемости. Комбинированная терапия антителом к NKG2A либо с антителами к mPD-1, либо с антителами к mLAG-3 увеличивала коэффициент выживаемости до 50% и 70%

соответственно. Тройная комбинация антител к mNKG2A, антител к mPD-1 и антител к mLAG-3 давала наибольший эффект с коэффициентом выживаемости 80%.

На фиг. 44 показано, что после обработки антителом к mNKG2A на мышиной модели карциномы прямой кишки CT26 уровень экспрессии NKG2A уменьшался как на NK-клетках селезенки, так и на NK-клетках из группы противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (TIL) в сравнении с изотипическим контролем.

На фиг. 45 показаны результаты в отношении экспрессии NKG2A по результатам оценки с помощью иммуногистохимии у опухолей различных типов.

На фиг. 46 показан профиль связывания FITC-конъюгированного антитела NKG2A.6 на нескольких опухолях.

На фиг. 47 показаны результаты в отношении экспрессии HLA-E у опухолей 7 различных типов по результатам оценки с помощью иммуногистохимии.

На фиг. 48 показаны наглядные изображения экспрессии HLA-E у опухолей различных типов по результатам оценки с помощью иммуногистохимии.

На фиг. 49A-B показаны уровни растворимого HLA-E у здоровых пациентов контрольной группы и у пациентов с раковым заболеванием.

На фиг. 50 показан план клинической разработки для рассматриваемых в настоящем документе антител к NKG2A, который предусматривал стадии отбора пациентов и различные комбинированные терапии с рассматриваемыми в настоящем документе антителами к NKG2A.

На фиг. 51A-D представлены графики, на которых показана кинетика и аффинность связывания антитела NKG2A.9, которая определена с помощью анализа Biacore.

На фиг. 52A-B показана кинетика и аффинность связывания NKG2A.9 по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда.

На фиг. 53 показаны результаты анализа дегрануляции NK-клеток, в которых сравнивали P1-069366 с NKG2A.9 и изотипическим контролем. В анализе дегрануляции NK-клеток функциональность наблюдали у антитела NKG2A.9, но не у антитела P1-069366.

На фиг. 54A-C показаны результаты применения *in silico* инструмента связывания с HLA для анализа антитела 13F3.A4 в отношении нежелательных кластеров связывания. На фиг. 54A-C раскрыты последовательности под SEQ ID NO: 197-204 соответственно в порядке их появления сверху вниз.

На фиг. 55 показаны результаты *in vitro* анализа пролиферации DC:T-клеток для демонстрации низкого риска иммуногенности антител к NKG2A, в частности антител NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11.

На фиг. 56A-D показана аффинность связывания антитела NKG2A.9 с гетеродимерами человеческого NKG2A-CD94 (фиг. 56A-B) и гетеродимерами NKG2C-CD94 (фиг. 56C-D) при 37°C, которая определена методом Biacore при использовании определения кинетических параметров за один цикл (фиг. 56A и 56C), так и при использовании определения кинетических параметров за несколько циклов (фиг. 56B и 56D). SPR-ответ показан в зависимости от ассоциации и диссоциации аналита.

На фиг. 57 показана ящичковая диаграмма общей оценки положительных результатов по HLA-E у опухолей 16 различных типов по результатам оценки с помощью иммуногистохимии. Общая оценка по HLA-E определяется как процент положительных результатов по комбинированному цитоплазматическому и/или мембранному HLA-E у опухолевых клеток.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к выделенным антителам, таким как моноклональные антитела, например, гуманизированным, человеческим и химерным моноклональным антителам, которые специфически связываются с человеческим NKG2A («hNKG2A») и обладают антагонистической активностью для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A содержат определенные структурные элементы, такие как CDR-участки, содержащие определенные аминокислотные последовательности. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела к NKG2A конкурируют за связывание с белком NKG2A человека или связываются с тем же или схожим эпитопом, что и антитела к NKG2A по настоящему изобретению.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способам получения таких антител к NKG2A, иммуноконъюгатов и биспецифических молекул, содержащих такие антитела к NKG2A или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтических композиций, составленных так, чтобы они содержали антитела к NKG2A или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способам применения антител к NKG2A, либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами, например, другими иммуноонкологическими средствами (например, антителами), химиотерапией, лучевой терапией и/или хирургическим вмешательством, для усиления иммунного ответа. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем

документе антитела к NKG2A применяют для лечения ряда патологических состояний, в том числе, например, для безопасного и эффективного лечения рака и/или инфекций.

Важная роль иммунной системы заключается в ее способности различать нормальные клетки и «чужие» клетки. Таким образом, иммунная система может атаковать «чужие» клетки и оставлять нормальные клетки в покое. Опухоли экспрессируют антигены, которые хозяин распознает как «чужие». Иммунная система использует «контрольные точки», которые представляют собой молекулы на определенных иммуноцитах, которые необходимо активировать или инактивировать, чтобы начался иммунный ответ. Иногда опухолевые клетки могут использовать эти контрольные точки, чтобы избежать атаки иммунной системы. Некоторые иммуноонкологические лекарственные средства в качестве цели используют эти контрольные точки, действуя как ингибиторы контрольных точек. Белок запрограммированной смерти 1 (PD-1) является ингибитором контрольной точки, который играет роль тормоза, предотвращающий атаку Т-клеток на другие клетки организма. PD-1 делает это при его связывании с лигандом запрограммированной смерти 1 (PD-L1), белком некоторых нормальных (и раковых) клеток. При связывании PD-1 с PD-L1 данное взаимодействие дает Т-клетке сигнал не атаковать другие клетки. Некоторые раковые клетки содержат большие количества PD-L1, что помогает им уклоняться от иммунной атаки. Такие терапевтические средства, как моноклональные антитела, которые нацелены на данное взаимодействие PD-1/ PD-L1, такие как ниволумаб (Opdivo®), могут блокировать связывания PD-1/PD-L1, увеличивая иммунный ответ организма в отношении опухолевых клеток.

Ингибирующий рецептор клеток-натуральных киллеров группы 2A (NKG2A) является представителем семейства лектиновых рецепторов NKG2, которое также включает NKG2C, NKG2D и NKG2E. (Iwaszko and Bogunia-Kubik, *Arch Immunol Ther Exp*, 59:353-67 (2011)). NKG2A, NKG2C и NKG2E имеют высокую гомологию по их аминокислотной последовательности внеклеточных доменов, тогда как NKG2D является рецептором функционально иного типа. NKG2A образует гетеродимер с CD94. Среди гетеродимеров NKG2/CD94 единственным рецептором, который обладает ингибирующей функцией, является NKG2A/CD94, тогда как NKG2C/CD94 и NKG2E/CD94 являются активирующими рецепторами. NKG2D также является активирующим рецептором, но он не образует гетеродимер с CD94, равно как NKG2D не связывает HLA-E. Рецепторы NKG2/CD94 распознают неклассические молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (MHC), которые представляют собой человеческий лейкоцитарный антиген-E (HLA-E) у людей и Qa-1 у мышей. (Braud *et al*, *Nature*, 391:795-99 (1998), Vance *et al., J. Exp. Med.* 188:1841-48 (1998). NKG2A/CD94 связывается с HLA-E приблизительно

с шестикратно большей аффинностью, чем NKG2C/CD94. См. там же. NKG2A экспрессируется на клетке-натуральном киллере (NK), эффекторных $CD8_+$ Т-клетках/$CD8_+$ Т-клетках памяти, NKT и гамма-дельта (γδ) Т-клетках. Экспрессия NKG2A индуцируется при взаимодействии с Т-клеточным рецептором (TCR) и после стимуляции определенными цитокинами, в том числе IL-2, IL-10, IL-15, IL-18, IL-21, хотя способность цитокинов индуцировать экспрессию NKG2A зависит от взаимодействия с TCR (Cho, Blood, 118:116-28 (2011). NKG2A имеет два иммунорецепторных тирозиновых ингибиторующих мотива (ITIMS), которые передают внутриклеточные ингибирующие сигналы. (Kabat *et al*, J. Immunol, 169:1948-58 (2002); Le Dréan El, Eur. J. Immunol 28:264076 (1998). Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A ингибируют белок NKG2A и таким образом выполняют роль ингибиторов контрольных точек.

Определения

Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала приведены определения некоторых терминов. Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Дополнительные определения изложены в подробном описании. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, что можно понять посредством обращения к описанию в целом. Соответственно, термины, определение которым представлено непосредственно ниже, более полно определены с учетом настоящего описание в целом.

В контексте настоящего документа термин «NKG2A» относится к белку ингибирующего рецептора клеток-натуральных киллеров группы 2, который у человека кодируется геном NKG2A. NKG2A также известен как, например, представитель A семейства подобных антигену CD159 белков, NK-клеточный рецептор A, NKG2A-активирующий рецептор NK, NKG2-A/B-активирующий рецептор NK, лектинподобный рецептор C1 киллеров (CD159a) и интегральный мембранный белок NKG2-A/NKG2-B II типа.

Были обнаружены три изоформы белка NKG2A человека, соответствующие пяти вариантам мРНК-транскрипта.

Изоформа 1, соответствующая варианту 1 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 1 или 209, а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 2) и варианту 3 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 212, а аминокислотная последовательность представлена под

SEQ ID NO: 182), состоит из 233 аминокислот и представляет собой каноническую последовательность NGK2A. Вариант 3 изоформы 1 также является естественным вариантом, который имеет однонуклеотидный полиморфизм (SNP) по остатку 29, в котором аспарагин (N) заменен на серин (S), т. е. N29S (SEQ ID NO: 182).

Изоформа 2, соответствующая варианту 2 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 210, а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 206) и варианту 4 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 211, а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 207), лишена кодирующего экзона в рамке считывания, что приводит к отсутствию остатков 96-113 по сравнению с вариантом 1 и вариантом 3 соответственно, а также обозначается как NKG2A-изоформа NKG2-B. Вариант 4 имеет SNP N29S.

Изоформа 2, соответствующая варианту 5 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 208, а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 205), состоит из 228 аминокислот и не содержит остатков 229-233, кодирующих пять С-концевых аминокислот. Данный вариант также имеет SNP N29S.

Ниже приведены аминокислотные последовательности известных вариантов человеческого NGK2A.

(1) Вариант 1: изоформа 1 человеческого NGK2A (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 1 или 209 (регистрационный № NM 002259.5), а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 2 (регистрационный № NP 002250.2; UniProt ID P26715-1)):

MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100
HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150
NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200
SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233

(SEQ ID NO: 2)

(2) Вариант 2: изоформа 2 человеческого NGK2A также называется NKG2A-изоформой NKG2B (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 210 (регистрационный № NM 007328.4), а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 206 (регистрационный № NP 015567.2; UniProt ID P26715-2)):

MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100
CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150

ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLAFKHEI KDSDNAELNC AVLQVNRLKS 200
AQCGSSIIYH CKHKL 215

(SEQ ID NO: 206)

(3) Вариант 3: изоформа 1 человеческого NGK2A с выделенным жирным шрифтом и отдельно указанным SNP N29S (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 212 (регистрационный № NM 213658.2), а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 182 (регистрационный № NP 998823.1 или AAL65234.1):

MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNK**S**S ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100
HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150
NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200
SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233

(SEQ ID NO: 182)

(4) Вариант 4: изоформа 2 человеческого NKG2A, соответствующая варианту 4 (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 211 (регистрационный № NM_213657.2), а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 207 (регистрационный № NP 998822.1)):

MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNK**S**S ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100
CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150
ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLAFKHEI KDSDNAELNC AVLQVNRLKS 200
AQCGSSIIYH CKHKL 215

(SEQ ID NO: 207)

(5) Вариант 5: изоформа 3 человеческого NGK2A также называется NKG2A-изоформой C (нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 208 (регистрационный № NM 001304448.1), а аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 205 (регистрационный № NM 001291377.1)):

MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNK**S**S ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100
HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150
NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200
SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYH 228

(SEQ ID NO: 205)

В приведенной ниже таблице представлены сводные данные по регистрационным номерам ДНК и белка и соответствующим описанным выше SEQ ID NO.

Вариант NKG2A	**SEQ ID NO**	**Регистрационный № для ДНК** (GenBank, если не указано иное)	**Соответствующий SEQ ID NO для белка**	**Регистрационный № для белка** (GenBank, если не указано иное)
1	1 или 209	NM 002259.5	2	NP 002250.2; UniProt ID P26715-1
2	210	NM 007328.4	206	NP 015567.2; UnitProt ID P26715-2
3	212	NM 213658.2	182	NP 998823.1; AAL65234.1
4	211	NM 213657.2	207	NP 998822.1
5	208	NM 001304448.1	205	NP 001291377.1

Термин «антитело» или «иммуноглобулин», который в настоящем документе используют взаимозаменяемо, относится к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначаемого в настоящем документе как VH) и константного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначаемого в настоящем документе как CH). В некоторых антителах, например, естественных антителах IgG, константный участок тяжелой цепи состоит из шарнира и трех доменов: CH1, CH2 и CH3. В некоторых антителах, например, естественных антителах IgG, каждая легкая цепь состоит из вариабельного участка легкой цепи (сокращенно обозначенного в настоящем документе как VL) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена (сокращенно обозначенного в настоящем документе как CL). Участки VH и VL можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Тяжелая цепь может иметь или не иметь C-концевой лизин. Если в настоящем документе не указано иное, аминокислоты в

вариабельных участках пронумерованы с использованием системы нумерации Kabat, а аминокислоты в константных участках пронумерованы с использованием системы EU. Иммуноглобулин может принадлежать к любому из известных изотипов, включая IgA, секреторный IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. У некоторых видов изотип IgG подразделяется на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A относятся к подтипу IgG1. Иммуноглобулины, например, IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга максимум по нескольким аминокислотам. К «антителу» относятся, например, как естественные, так и неестественные антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела и полностью синтетические антитела.

В настоящем контексте «антитело IgG» имеет структуру естественного антитела IgG, т. е. оно имеет такое же количество тяжелых и легких цепей и дисульфидных связей, что и естественное антитело IgG того же подкласса. Например, антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 к NKG2A состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), причем две тяжелые цепи и легкие цепи связаны одинаковым количеством и расположением дисульфидных мостиков, которые встречаются в естественных антителах IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 соответственно (если антитело не подверглось мутации с модификацией дисульфидных связей).

«Антиген» представляет собой молекулу или вещество, которое запускает иммунный ответ и с которым связывается антитело. Антитела обычно специфически связываются с их родственным антигеном с высокой аффинностью, что отражается константой диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-11} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Любую K_D, превышающую приблизительно 10^{-4} М, обычно рассматривают как свидетельствующую о неспецифическом связывании. В контексте настоящего документа антитело, которое «специфически связывается» с антигеном, обозначает антитело, которое связывается с антигеном и практически идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает наличие K_D 10^{-6} М или менее, K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее или от 10^{-8} М до 10^{-10} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген «практически идентичен» данному антигену, если он обладает высокой степенью идентичности последовательности с данным антигеном, например, если он имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере

на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или более идентична последовательности данного антигена. В качестве примера, антитело, которое специфически связывается с NKG2A человека, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления вступает в перекрестную реакцию с антигенами NKG2A от некоторых видов приматов, отличных от человека (например, NKG2A яванского макака), но не вступает в перекрестную реакцию с антигенами NKG2A от других видов или с антигеном, отличным от NKG2A.

В контексте настоящего документа термин «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела используют в настоящем документе взаимозаменяемо, и он обозначает одну или несколько частей антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, NKG2A человека). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами или частями полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, например, описываемого в настоящем документе антитела к NKG2A, включают:

(1) Fab-фрагмент (фрагмент, получаемый в результате расщепления папаином) или аналогичный одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, LC и CH1;

(2) F(ab')2-фрагмент (фрагмент, получаемый в результате расщепления пепсином) или аналогичный двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке;

(3) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и CH1 доменов;

(4) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела,

(5) фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-46), который состоит из V_H домена;

(6) выделенный определяющий комплементарность участок (CDR); и

(7) комбинацию из двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером.

Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, их можно объединить рекомбинантными способами с помощью синтетического линкера, который позволяет создать из них единую белковую цепь, в которой участки V_L и V_H спариваются, образуя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечные 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). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела.

Эти фрагменты антител получают с помощью общепринятых методик, известных специалистам в настоящей области техники, а фрагменты подвергают скринингу на предмет полезности таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части можно получить методиками с применением рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

«Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее, например, две разные специфичности связывания, две разные пары тяжелых/легких цепей, что приводит к образованию двух сайтов связывания антигена со специфичностью к различным антигенам. Биспецифические антитела можно получить различными способами, включая слияние 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).

В контексте настоящего документа термин «моноклональное антитело» обозначает антитело, полученное из популяции практически однородных антител, т. е. отдельные антитела в популяции практически схожи и связывают один и тот же эпитоп(-ы) (например, антитела характеризуются единой специфичностью связывания и аффинностью), за исключением возможных вариантов, которые могут возникнуть во время продуцирования моноклонального антитела, при этом такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. Модификатор «моноклональное» указывает на характер антитела как полученного из практически однородной популяции антител, и в данном случае нет необходимости в получении антитела каким-либо конкретным способом. Термин «человеческое моноклональное антитело» обозначает антитело из популяции практически однородных антител, которое характеризуется единой специфичностью связывания и которое имеет вариабельные и необязательные константные участки, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулинов эмбрионального типа. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие моноклональные антитела получают гибридомным способом. При использовании гибридомного способа трансгенное животное, отличное от человека, например, трансгенную мышь, подвергают воздействию антигена, и лейкоцит, известный как В-клетка, продуцирует антитела, которые связываются с антигеном, взятым от трансгенного животного, отличного от человека. Выделенные В-клетки сливают с иммортализованной клеткой с получением линии гибридных клеток, называемой гибридомой. В соответствии с одним вариантом осуществления гибридома имеет геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

В контексте настоящего документа термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как (1) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или полученной из него гибридомы, (2) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (3) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, и (4) антитела, полученные, экспрессированные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельные и константные участки, которые используют определенные последовательности эмбрионального типа иммуноглобулинов, кодируются генами эмбрионального типа, но включают последующие перестройки и мутации, которые возникают, например, во время созревания антител. Как известно из уровня техники (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), вариабельный участок содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые перестраиваются, формируя антитело, специфичное к чужеродному антигену. Помимо перестройки, вариабельный участок можно дополнительно модифицировать несколькими изменениями отдельных аминокислот (называемыми соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет изменяться при дальнейшем ответе на антиген (т. е. переключение изотипа). Таким образом, перестроенные и несущие соматические мутации молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не быть идентичны по последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, но скорее будут практически идентичными или схожими (например, будут по меньшей мере на 80% идентичными).

В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» обозначает антитело, имеющее вариабельные участки, в которых как каркасные, так и CDR-участки получены из последовательностей эмбрионального типа иммуноглобулина человека. Кроме того, если антитело содержит константный участок, константный участок также получен из последовательностей эмбрионального типа иммуноглобулина человека. Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями эмбрионального типа иммуноглобулина

человека (например, из-за мутаций, введенных случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из последовательностей эмбрионального типа других отличных от человека видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. В контексте настоящего документа термины «человеческие» и «полностью человеческие» антитела используют взаимозаменяемо.

«Гуманизированное антитело» обозначает антитело, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR отличного от человеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, полученными из человеческих антител. В соответствии с одним вариантом осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из человеческих антител, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одного или нескольких участков CDR остались неизменными. Допускаются незначительные добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, если они не предотвращают связывание антитела с определенным антигеном. «Гуманизированное антитело» сохраняет антигенную специфичность, схожую со специфичностью исходного антитела.

«Химерное антитело» обозначает антитело, в котором вариабельные участки происходят от одного вида, а константные участки происходят от другого вида, такое как антитело, в котором вариабельные участки происходят от мышиного антитела, а константные участки происходят от человеческого антитела.

Применяемый в контексте настоящего документа термин «изотип» обозначает класс антител (например, антитело IgG, (в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgA (в том числе IgA1 и IgA2), IgD и IgE), который кодируется генами константных участков тяжелой цепи антитела.

«Аллотип» относится к естественным вариантам в определенной группе изотипов, причем эти варианты отличаются по нескольким аминокислотам. (См., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1). Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A могут быть любого аллотипа. В контексте настоящего документа антитела, обозначаемые как изотип «IgG1f», «IgG1.1f» или «IgG1.3f», представляют собой антитела IgG1, безэффекторные антитела IgG1.1 или безэффекторные антитела IgG1.3 аллотипа «f» соответственно.

Фразы «антитело, распознающее антиген», и «антитело, специфическое к антигену», применяют в настоящем документе взаимозаменяемо с фразой «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

В контексте настоящего документа термин «выделенное антитело» обозначает антитело, которое практически не содержит других белков и клеточных материалов.

В контексте настоящего документа «эффекторная функция» обозначает взаимодействие Fc-участка антитела с Fc-рецептором или лигандом или биохимическое явление, которое возникает в результате этого. К иллюстративным «эффекторным функциям» относятся связывание с C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP), и даунрегуляция рецептора на клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR). Для таких эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-участок был объединен со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела).

«Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-участком иммуноглобулина. К FcR, которые связываются с IgG-антителом, относятся рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей, FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIIA у людей) рецепторов и одного ингибирующего (FcγRIIb или эквивалентно FcγRIIB) рецептора. Из уровня техники известны различные иллюстративные свойства человеческих FcγR. Большинство природных типов эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIb, тогда как клетки-натуральные киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не ингибирующий FcγRIIb у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и считается эквивалентным мышиному IgG2a по отношению к типам активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

В контексте настоящего документа «Fc-участок» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), или «Fc-домен», или «Fc» относится к C-концевому участку тяжелой цепи антитела, который опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-участок содержит константный участок антитела, за исключением иммуноглобулинового домена первого константного участка (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-участок содержит два идентичных фрагмента белка, происходящих из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела. В изотипах антител

IgM и IgE Fc-участки содержат три константных домена тяжелой цепи (домены 2-4 CH) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG Fc-участок содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между доменами CH1 и CH2. Хотя определение границ Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина может варьировать, как определено в настоящем документе, Fc-участок тяжелой цепи человеческого IgG определяют как занимающий от аминокислотного остатка D221 в случае IgG1, V222 в случае IgG2, L221 в случае IgG3 и P224 в случае IgG4 до карбокси-конца тяжелой цепи, причем нумерация представлена согласно системе EU, как у Kabat (Kabat, *et al.*, 1991). Домен CH2 Fc-участка человеческого IgG простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, а домен CH3 расположен на C-концевой стороне домена CH2 в Fc-участке, т. е. простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 или 446 (если отсутствует C-концевой остаток лизина) или 445 (если отсутствует C-концевой остаток лизина) в IgG. В контексте настоящего документа Fc-участок может представлять собой Fc с природной последовательностью, включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, неестественный Fc). Fc может также обозначать данный участок в выделенном виде или в контексте полипептида, содержащего Fc, такого как «связывающий белок, содержащий Fc-участок», также называемый «слитым с Fc белком» (например, антитело или иммуноадгезин).

«Fc-участок с природной последовательностью» или «Fc с природной последовательностью» имеет аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности Fc-участка, встречающегося в природе. Человеческие Fc-участки с природной последовательностью включают Fch-участок с природной последовательностью IgG1 человека; Fc-участок с природной последовательностью IgG2 человека; Fc-участок с природной последовательностью IgG3 человека; и Fc-участок с природной последовательностью IgG4 человека, а также их естественные варианты. Природная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc-участков. (См., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» обозначает сайт на антигене (например, белке hNKG2A), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело, например, который определен специализированным способом, применяемым для его идентификации. Эпитопы могут быть образованы как из (1) смежных аминокислот (обычно в случае линейного эпитопа), так и из (2) несмежных аминокислот, совмещенных при третичной укладке белка (обычно в случае конформационного эпитопа). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при третичной укладке, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями.

Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин «картирование эпитопов» обозначает процесс идентификации молекулярных детерминант для распознавания антителом антигена. Способы определения того, какие эпитопы связываются данным антителом (т. е. картирование эпитопов), хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, иммуноблоттинг и анализы методом иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды из белков (например, из NKG2A) тестируют в отношении реактивности с данным антителом (например, антителом к NKG2A). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные из уровня техники и описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию, мутационный анализ антигена, двумерный ядерный магнитный резонанс, дрожжевой дисплей и масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,* Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин «связывается с одним и тем же эпитопом» применительно к двум или более антителам означает, что, по результатам определения данным способом, антитела связываются с одним и тем же сегментом из аминокислотных остатков. Методики определения того, связываются ли антитела с «одним и тем же эпитопом на NKG2A» с описываемыми в настоящем документе антителами, включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгенографический анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа, HDX-MS, и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). Другие способы позволяют отслеживать связывание антитела с фрагментами антигена (например, протеолитическими фрагментами) или с мутантными вариантами антигена, при этом потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности зачастую считают показателем эпитопного компонента, например, как в случае сканирующего аланином мутагенеза (Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081) или дрожжевого дисплея мутантных вариантов целевой последовательности. Кроме того, также можно применять вычислительные комбинаторные способы картирования эпитопов. Такие способы основаны на способности представляющего интерес антитела аффинно выделять специфические короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек на основе фагового дисплея. Согласно ожиданиям, с одним и тем же эпитопом будут связываться антитела, имеющие одинаковые VH и VL или одинаковые последовательности CDR1, CDR2 и CDR3.

Антитела, которые «конкурируют с другим антителом за связывание с целевой молекулой», относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с целевой молекулой. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с целевой молекулой, т. е. будет ли и в какой степени одно антитело ингибировать связывание другого антитела с целевой молекулой, можно определить с помощью известных экспериментов по конкуренции за связывание, например, анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore®. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с целевой молекулой по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является «блокирующим антителом» (т. е. холодовым антителом, которое инкубируют первым с целевой молекулой). Конкурентные анализы можно проводить так, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc. 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в Chapter 11 of "Using Antibodies" by 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 вариантах не менее чем на 50%, т. е. независимо от того, приводят ли одно или другое антитело в контакт первым с антигеном в конкурентном эксперименте.

Анализы конкурентного связывания для определения того, конкурируют ли два антитела или перекрестно конкурируют за связывание, включают конкуренцию за связывание с Т-клетками, экспрессирующими NKG2A, например, методом проточной цитометрии. К другим способам относятся следующие: SPR (например, Biacore®); твердофазный прямой или косвенный радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или косвенный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой EIA с биотином и авидином (см. Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с использованием метки; твердофазный прямой сэндвич-анализ с использованием метки (см., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой RIA с использованием метки I-125 (см. Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA с биотином и авидином (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); и прямой RIA с использованием метки. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

В контексте настоящего документа термины «специфическое связывание», «избирательное связывание», «избирательно связывается» и «специфически связывается» обозначают связывание антитела с эпитопом на заданном антигене. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления антитело: (1) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) примерно менее 10^{-6} М, такой как примерно менее 10^{--7} М, 10^{8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, при определении, например, с помощью методики SPR в устройстве для SPR от Biacore® с применением заданного антигена, например, рекомбинантного NKG2A человека, в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или анализа связывания антитела с антиген-положительными клетками по Скэтчарду; и (2) связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Следовательно, антитело, которое «специфически связывается с NKG2A человека», относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клетками NKG2A человека с K_D 10^{-6} М или менее, такой как примерно менее 10^{--7} М, 10^{8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже. Антитело, которое «перекрестно реагирует с NKG2A яванского макака», относится к антителу, которое связывается с NKG2A яванского макака с K_D 10^{-6} М или менее, такой как примерно менее 10^{-7}, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже.

Термины «k_a», «$k_{ассоциации}$» или «k_{on}» используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения константы скорости ассоциации взаимодействия конкретного антитела и антигена. Термины «k_d», «$K_{диссоциации}$» или «k_{off}» используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения константы скорости диссоциации взаимодействия конкретного антитела и антигена. В контексте настоящего документа термин «K_D» обозначает равновесную константу диссоциации, которую получают из отношения k_d к k_a (т. е. k_d/k_a) и выражают в виде мольной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определить с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники. К доступным способам определения K_D антитела относятся без ограничения поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с использованием, например, биосенсорной системы, такой как система Biacore®, проточная цитометрия и анализ Скэтчарда.

Термин «IC_{50}» означает половину максимальной ингибирующей концентрации и позволяет измерять активность вещества, например, антитела, по ингибированию определенного биологического или биохимического ответа. Другими словами, IC_{50} используют как показатель активности; чем меньше IC_{50}, тем более активным является вещество. В контексте *in vitro* или *in vivo* анализа с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента IC_{50} обозначает концентрацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая снижает максимальный биологический или биохимический ответ на 50%.

Термин «EC_{50}» означает половину максимальной эффективной концентрации и позволяет измерять активность вещества, например, антитела, по индукции определенного биологического или биохимического ответа. Как и в случае с IC_{50}, EC_{50} используют как показатель активности; чем меньше EC_{50}, тем более активным является вещество. В контексте *in vitro* или *in vivo* анализа с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента EC_{50} обозначает концентрацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, который составляет 50% от максимального биологического или биохимического ответа.

В контексте настоящего документа термин «рецепторная занятость» или «занятость рецептора» относится к количеству антитела (например, описываемых в настоящем документе антител к NKG2A), которое связано с иммуностимулирующим рецептором (например, человеческим NKG2A). «Процент (%) рецепторной занятости» или «процент (%) занятости рецептора» можно рассчитать по следующей формуле: ([ΔMFI тестового] / [ΔMFI общего])×100. Изменение средней единицы флуоресценции (ΔMFI) рассчитывают путем вычитания MFI фонового окрашивания антителом изотипического контроля из MFI связанного антитела. Общий уровень рецептора определяют путем добавления насыщающего количества антитела для определения максимальной экспрессии и, следовательно, MFI конкретного иммуностимулирующего рецептора. Альтернативным способом расчета общей экспрессии рецептора является применение антитела к тому же иммуностимулирующему рецептору, которое не конкурирует с антителом, для которого рассчитывают занятость рецептора.

В контексте настоящего документа термин «природное» применительно к веществу обозначает вещество, которое присутствует в природе и не было намеренно модифицировано людьми. Например, природной является полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована людьми в лаборатории.

«Полипептид» обозначает цепь, содержащую по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка, без верхнего предела по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такуюкак без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидную связь. «Белок» подразумевает один или несколько полипептидов.

Применяемый в контексте настоящего документа термин «молекула нуклеиновой кислоты» понимают как включающий молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула

нуклеиновой кислоты является одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой комплементарную ДНК (кДНК).

Термин «кДНК» или «комплементарная ДНК» относится к неестественной молекуле нуклеиновой кислоты, которая была создана или получена из мРНК, т. е. были удалены некодирующие участки.

В контексте настоящего документа термин «консервативные модификации последовательности» относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего такую аминокислотную последовательность. К таким консервативным модификациям относятся аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно включить в антитело по настоящему изобретению с помощью известных в настоящей области техники стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и опосредуемый полимеразной цепной реакцией (ПЦР) мутагенез. «Консервативные аминокислотные замены» обозначают замены аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, имеющий схожую боковую цепь. В уровне техники приведено определение семейств аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), 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). В соответствии с определенными вариантами осуществления предполагаемый вспомогательный аминокислотный остаток в антителе к NKG2A заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в настоящей области техники (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)).

Для нуклеиновых кислот термин «существенная гомология» указывает, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны, с учетом соответствующих нуклеотидных вставок или делеций, по меньшей мере приблизительно по 80% нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно по 90-95% или по меньшей мере приблизительно по 98-99,5% нуклеотидов.

Альтернативно, существенная гомология существует, если сегменты будут гибридизироваться в условиях избирательной гибридизации с комплементарной цепью нуклеиновой кислоты.

Для полипептидов термин «существенная гомология» указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны, с учетом соответствующих аминокислотных вставок или делеций, по меньшей мере приблизительно по 80% аминокислот, по меньшей мере приблизительно по 90-95% или по меньшей мере приблизительно по 98-99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений у последовательностей (т. е. процент гомологии = (количество идентичных положений) / (общее количество положений)×100), с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо внести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно произвести с помощью математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить, например, с помощью программы GAP в программном пакете GCG с применением матрицы nwsgapdna.cmp и штрафа за открытие гэпа, равного 40, 50, 60, 70 или 80, а также штрафа за продление гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определить с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версии 2.0), с применением таблицы массы остатков PAM120, штрафа за продление гэпа, равного 12, и штрафа за открытие гэпа, равного 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG, с применением либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа, равного 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, а также штрафа за продление гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описываемые в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка можно также применять в качестве «последовательности запроса» для выполнения поиска по открытым базам данных, например, для выявления родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с помощью программ NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Нуклеотидные поиски

BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных описываемым в настоящем документе молекулам нуклеиновой кислоты. Белковые поиски BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных описываемым в настоящем документе белковым молекулам. Для получения результатов выравнивания с введенными гэпами с целью сравнения можно применять 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., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI), доступный по адресу https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, например, в клетке-хозяине, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «практически очищенной», если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, при помощи стандартных методик, включая щелочную/SDS обработку, CsCl связывание, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. (См. F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)).

В контексте настоящего документа термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем документе «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). К

векторам экспрессии, используемым в методиках рекомбинантной ДНК, относятся плазмиды. В контексте настоящего документа термины «плазмида» и «вектор» можно использовать взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто применяемой формой вектора. Тем не менее, также включены и другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по функции репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин «клетка-хозяин» или «рекомбинантная клетка-хозяин», который применяют взаимозаменяемо, обозначает клетку, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в норме не присутствует в клетке, и, возможно, клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины обозначают не только конкретную рассматриваемую клетку, но и потомство такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут произойти определенные модификации из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все еще будет входить в объем применяемого в настоящем документе термина «клетка-хозяин».

«Иммунный ответ» имеет такое же определение, как и в настоящей области техники, и обозначает биологический ответ у позвоночного против чужеродных агентов или патологических, например, раковых клеток, причем такой ответ защищает позвоночного от этих агентов и заболеваний, которые они вызывают. Иммунный ответ опосредуется действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки-натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, продуцируемыми любой из этих клеток или печенью (в том числе антителами, цитокинами и комплементом), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию с, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или других патологических клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей, в том числе, например, человеческих клеток или тканей. Иммунная реакция включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки или Т-хелперной (Th) клетки, такой как CD4+ или CD8+ Т-клетка, или ингибирование или истощение Treg-клетки.

«Эффекторные Т-клетки» («Teff») представляют собой Т-клетки (например, CD4+ и CD8+ Т-клетки) с цитолитической активностью, а также Т-хелперные (Th) клетки. Th-клетки секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но

не включают регуляторные Т-клетки (Treg-клетки).

Т-регуляторные («Treg») клетки представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предупреждают развитие аутоиммунных заболеваний. В-клетки памяти представляют собой подтип В-клеток, которые образуются в зародышевых центрах после первичной инфекции и важны для формирования ускоренного и более стойкого иммунного ответа, опосредованного антителами, в случае повторного инфицирования (также известного как вторичный иммунный ответ).

«Клетки-натуральные киллеры» (NK-клетки) являются важными медиаторами иммунного ответа против патогенов и опухолей и являются частью врожденной иммунной системы. NK-клетки также играют роль в регуляции адаптивного иммунного ответа, и было показано, что в различных контекстах они стимулируют или ингибируют Т-клеточные ответы. NK-клетки обеспечивают быстрый ответ на инфицированные вирусом клетки и отвечают на образование опухоли.

В контексте настоящего документа термин «Т-клеточный ответ» обозначает ответ, опосредуемый Т-клетками, например, эффекторными Т-клетками (например, CD8+ клетками) и хелперными Т-клетками (например, CD4+ клетками). К Т-клеточным ответам относятся, например, Т-клеточная цитотоксичность и пролиферация.

Применяемый в контексте настоящего документа термин «цитотоксический Т-лимфоцитарный (CTL) ответ» обозначает иммунный ответ, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. CD8+ Т-клетками опосредуются, например, CTL-ответы.

«Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» обозначает средство, например, компонент сигнального пути, которое может участвовать в модуляции, регуляции или модификации иммунного ответа. «Модуляция», «регуляция» или «модификация» иммунного ответа обозначает любое изменение в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки, такой как Th1-клетка). Такая модуляция включает стимуляцию или супрессию иммунной системы, которая может проявляться в увеличении или уменьшении количества клеток различных типов, увеличении или уменьшении активности этих клеток и/или любых других изменениях, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут обладать усиленной функцией в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. «Иммуномодуляторная целевая молекула» или «иммунорегуляторная целевая молекула» представляет собой иммуномодулятор, который выступает в качестве целевой

молекулы для связывания и активность которого изменяется при связывании вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. К иммуномодуляторным целевым молекулам относятся, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодуляторные рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодуляторные лиганды»).

«Иммунотерапия» обозначает лечение субъекта, такого как субъект-человек, страдающего или подверженного риску заражения или рецидива заболевания, способом, предусматривающим индукцию, усиление, супрессию или иную модификацию иммунного ответа.

«Иммуностимулирующая терапия» или «иммуностимуляторная терапия» обозначает терапию, которая приводит к увеличению (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, для лечения рака.

«Усиление эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или действенности существующего иммунного ответа у субъекта, такого как субъект-человек. Такое повышение эффективности и действенности можно достичь, например, путем преодоления механизмов, которые супрессируют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Применяемый в контексте настоящего документа термин «связанный» обозначает ассоциацию двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т. е. рекомбинантно слитой). Такие связи можно создать с помощью широкого спектра известных в настоящей области техники методик, таких как химическое конъюгирование и получение рекомбинантного белка.

В контексте настоящего документа термин «введение» обозначает физическое введение композиции, содержащей терапевтическое средство, например, антитело к NKG2A, субъекту с помощью любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. «Введение» включает, например, введение пациенту-человеку другим человеком, таким как, например, один или несколько медицинских работников, и самостоятельное введение, осуществляемое пациентом-человеком. Различные пути введения для описываемых в настоящем документе антител включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте настоящего документа фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, такие как путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутричерепную, внутрикапсулярную,

внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, внутриспиральную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, описываемое в настоящем документе антитело можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или чрезслизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно производить, например, за один раз, несколько раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

В контексте настоящего документа дополнительное или комбинированное введение (совместное введение) включает одновременное введение соединений в одной и той же или другой лекарственной форме или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, первое антитело, например, антитело к NKG2A, и второе, третье или более антител можно одновременно вводить в одном составе. Альтернативно, первое и второе (или более) антител можно составить для раздельного введения и вводить параллельно или последовательно. «Комбинированная» терапия в контексте настоящего документа означает введение двух или более терапевтических средств скоординированным образом и предусматривает без ограничения параллельное введение доз. В частности, комбинированная терапия предусматривает как совместное введение (например введение совместного состава или одновременное введение отдельных терапевтических композиций) и серийное или последовательное введение при условии, что введение одного терапевтического средства каким-либо образом обусловлено введением другого терапевтического средства. Например, одно терапевтическое средство можно вводить только после того, как было введено другое терапевтическое средство и ему дали подействовать в течение предписанного периода времени. (См, например, Kohrt *et al.* (2011) *Blood* 117:2423).

Например, сначала можно вводить антитело к NKG2A, а затем (например, сразу же после этого) вводить второе антитело или наоборот. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к NKG2A вводят до введения второго антитела. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело к NKG2A вводят, например, приблизительно за 30 минут до второго антитела. Такое одновременное или последовательное введение предпочтительно приводит к тому, что оба антитела одновременно присутствуют у подвергаемых лечению пациентов.

В контексте настоящего документа термины «ингибирует» или «блокирует» применяют взаимозаменяемо, и они охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления

описываемое в настоящем документе антитело к NKG2A ингибирует связывание NKG2A с HLA-E по меньшей мере приблизительно на 50%, например, приблизительно на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, что определяют так, например, как описано далее в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A ингибирует связывание NKG2A с HLA-E не более чем на 50%, например, приблизительно на 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%, что определяют, например, так, как далее описано в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом патологических клеток в организме. Нерегулируемые рост и деление клеток могут привести в результате к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые инвазируют соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части организма по лимфатической системе или кровотоку.

В контексте настоящего документа термины «лечить», «проводить лечение» и «лечение» относятся к любому типу вмешательства или процессу, производимому на субъекте, или к введению активного средства субъекту с целью обращения, облегчения, ослабления, ингибирования, или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. В отличие от этого, термин «профилактика» или «предупреждение» относится к введению субъекту, у которого нет заболевания, с целью предупреждения возникновения заболевания. В контексте настоящего документа термины «лечить», «проводить лечение» и «лечение» не охватывают профилактику или предупреждение.

Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяют 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 снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предупреждение нарушения функционирования или инвалидизации вследствие заболевания. «Профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная дозировка» лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим

средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или страдающему рецидивом заболевания, предупреждает развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического средства стимулировать регрессию заболевания или способность профилактического средства предупреждать развитие или рецидив заболевания можно оценить с помощью различных способов, известных специалисту-практику, например, на субъектах-людях во время клинических испытаний, на животных модельных системах, позволяющих прогнозировать эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

Введение эффективных количеств отдельно антитела к NKG2A или антитела к NKG2A в сочетании, например, с антителом к PD-1, в сочетании с антителом к PD-L1 или в сочетании с антителом к CTLA- 4 в соответствии с любым из представленных в настоящем документе способов может привести по меньшей мере к одному терапевтическому эффекту, в том числе, например, к уменьшению роста или размера опухоли, уменьшению количества метастатических очагов, появляющихся с течением времени, к полной ремиссии, частичной ремиссии или стабилизации заболевания. Например, способы лечения дают сравнимый уровень клинической пользы (CBR = полная ремиссия (CR) + частичная ремиссия (PR) + стабильное заболевание (SD), продолжающееся $\geq$ 6 месяцев), который лучше, чем достигаемый без введения антитела к NKG2A или чем достигаемый при введении одного из входящих в комбинацию антител отдельно, например, улучшение уровня клинической пользы составляет приблизительно 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более.

В качестве примера, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование рака или содействует регрессии рака у субъекта, в том числе у субъекта-человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака до состояния устранения рака. «Содействие регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, предупреждению нарушения функционирования или инвалидизации вследствие заболевания или другому облегчению симптомов заболевания у пациента. «Фармакологическая эффективность», «эффективность» или «эффективность действия» относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии рака у пациента. «Физиологическая безопасность» относится к приемлемо низкому уровню

токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном, органном и/или организменном уровне (неблагоприятным эффектам), возникающим в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера, для лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства ингибирует рост опухолевых клеток по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30% по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на более 70%, по меньшей мере приблизительно на 80% относительно субъектов без лечения или по меньшей мере приблизительно на 90%. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество или терапевтически эффективная дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или опухолевый рост, т. е. ингибирует рост клеток или опухолевый рост на 100%. Способность соединения, в том числе антитела, ингибировать опухолевый рост можно оценить с помощью описанных в настоящем документе анализов. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить путем изучения способности соединения ингибировать рост клеток; такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в настоящей области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирование роста опухоли может быть не сразу после лечения, а может происходить лишь спустя определенный период времени или после повторного введения. В соответствии с другими описанными в настоящем документе вариантами осуществления, регрессия опухоли наблюдается и продолжается в течение по меньшей мере приблизительно 20 суток, по меньшей мере приблизительно 30 суток, по меньшей мере приблизительно 40 суток, по меньшей мере приблизительно 50 суток или по меньшей мере приблизительно 60 суток или дольше.

В контексте настоящего документа термины «фиксированная доза», «базовая доза» и «базовая фиксированная доза» используют взаимозаменяемо, и они обозначают дозу, которую вводят пациенту без учета массы тела или площади поверхности тела у пациента. Поэтому фиксированную или базовую дозу не приводят в виде дозы мг/кг, а скорее в виде абсолютного количества терапевтического средства.

В контексте настоящего документа термин доза или дозировка «по массе» означает, что доза, вводимая пациенту, рассчитана на основе массы пациента. Например, если 60 кг пациенту требуется 3 мг/кг антитела к NKG2A, можно рассчитать и применять соответствующее количество антитела к NKG2A (т. е. 180 мг) для введения.

Термин «пациент» включает людей и других млекопитающих, которые получают терапевтическое или профилактическое лечение.

Термин «субъект» включает любого человека или отличного от человека животного. Например, описываемые в настоящем документе способы и композиции можно применять для лечения болеющего раком субъекта. К отличному от человека животному относятся все позвоночные животные, например, млекопитающие и не млекопитающие, в том числе отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. д. В соответствии с одним вариантом осуществления субъектом является человек.

В контексте настоящего документа термины в форме единственного числа обозначают один или несколько таких объектов, если не указано иное; например, термин «нуклеотидная последовательность» понимают как обозначающий одну или несколько нуклеотидных последовательностей. В силу этого, термины в форме единственного числа или в форме «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего документа «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов друг с другом или друг без друга. Таким образом, термин «и/или», применяемый в контексте такой фразы, как «A и/или B», включает «A и B», «A или B», только «A» и только «B». Аналогичным образом, термин «и/или», применяемый в такой фразе, как «A, B и/или C», охватывает каждого из следующих: A, B и C; A, B или C; A или C; A или B; B или C; A и C; A и B; B и C; только A; только B; и только C.

Понятно, что везде, где аспекты в настоящем документе описаны формулировкой «содержащий», также предусмотрены аналогичные аспекты, описываемые выражением «состоящий из» и/или «фактически состоящий из».

Единицы, приставки и символы обозначены в их принятой метрической системой единиц измерений (СИ) форме, если не указано иное. Числовые диапазоны включают числа, определяющие такой диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записаны слева направо в ориентации от 5’ к 3’. Аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу.

В контексте настоящего документа термин «приблизительно» или «примерно» означает грубо, около или в районе. При применении термина «приблизительно» в сочетании с числовым диапазоном он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В общем, термин «приблизительно» может модифицировать числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов вверх или вниз (в большую или меньшую сторону).

Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, и их следует истолковывать посредством обращения к описанию в целом. Соответственно, термины, определение которым представлено непосредственно ниже, более полно определены с учетом настоящего описание в целом. Различные описываемые в настоящем документе аспекты более подробно описаны в последующих подразделах.

I. Антитела к NKG2A

В настоящем раскрытии описаны, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A, такие как полностью человеческие гуманизированные и химерные антитела с требуемыми функциями или свойствами. Например, антитела специфически связывают белок NKG2A человека с высокой аффинностью. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела представляют собой антагонистические антитела, которые блокируют или обращают NKG2A-опосредованное ингибирование таких иммуноцитов, как Т-клетки и NK-клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A человека (антитела к huNKG2A) обладают требуемыми свойствами для их применения в качестве терапевтических средств при лечении таких заболеваний, как различные формы рака или инфекции.

Конкретными описываемыми в настоящем документе антителами к NKG2A являются антитела с последовательностями CDR и/или вариабельных участков из антител 13F3.A4, NKG2A.6, NKG2A.7, NKG2A.8, NKG2A.9, NKG2A.11, выделенных и охарактеризованных в отношении структуры так, как описано в настоящем документе, а также антитела, которые по меньшей мере на 80% идентичны (например, по меньшей мере на 85% идентичны, по меньшей мере на 90% идентичны, по меньшей мере на 95% идентичны или по меньшей мере на 99% идентичны) аминокислотным последовательностям из описываемых в настоящем документе антител к NKG2A. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A по меньшей мере на 80% идентичны (например, по меньшей мере на 85% идентичны, по меньшей мере на 90% идентичны, по меньшей мере на 95% идентичны или по меньшей мере на 99% идентичны) последовательностям вариабельного участка или CDR из описываемых в настоящем документе антител к NKG2A.

Согласно некоторым аспектам, антитела по настоящему изобретению характеризуются особыми функциональными признаками или свойствами. Например, антитела специфически связываются с NKG2A человека с высокой аффинностью. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A ингибируют связывание NKG2A с его лигандом HLA-E, что восстанавливает ответы с участием NK- и Т-клеток в отношении опухолей, которые экспрессируют HLA-E. Другими словами, описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A стимулируют противоопухолевые ответы с участием Т-клеток и NK-клеток путем ингибирования или блокирования взаимодействия между белком NKG2A и его лигандом HLA-E.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

(1) специфически связываются с белком NKG2A человека;

(2) блокируют или уменьшают связывание и/или взаимодействие лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека; (в соответствии с другими вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A блокируют или уменьшают связывание и/или взаимодействие лиганда NKG2A с белком NKG2A отличного от человека животного);

(3) обращают опосредованную NKG2A передачу ингибирующих сигналов;

(4) не связываются или связываются с низкой аффинностью с белком NKG2C человека;

(5) с высокой аффинностью связываются с NKG2A человека и яванского макака;

(6) не связываются или обладают низкой аффинностью к NKG2A мыши или крысы;

(7) не препятствуют активирующему сигналу, возникающему в результате связывания HLA-E с белком NKG2C;

(8) обладают уменьшенным связыванием с человеческим Fc-гамма-рецептором (FcγR);

(9) индуцируют и/или усиливают противоопухолевый иммунный ответ;

(10) усиливают функциональную активность Т-клеток; (в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, увеличивают цитотоксическую функцию Т-клеток, измеряемую, например, по лизису HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток);

(11) усиливают функциональную активность клеток-натуральных киллеров (NK-клеток) путем, например, индукции активации NK-клеток;

(12) увеличивают продуцирование цитокинов, например, IFNγ; и/или

(13) специфично связываются с эпитопом, расположенным в дискретных участках, содержащих следующие аминокислотные остатки, которые определены с помощью HDX-MS и/или картирования эпитопов методом FPOP:

участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 из последовательности под SEQ ID NO: 2;

участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 из последовательности под SEQ ID NO: 2;

участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 из последовательности под SEQ ID NO: 2;

участок 4: L (аминокислотный остаток 206 из последовательности под SEQ ID NO: 2); и

участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 из последовательности под SEQ ID NO: 2).

(14) специфично связываются с эпитопом, расположенным в дискретных участках, содержащих следующие аминокислотные остатки, которые определены с помощью HDX-MS:

участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 из последовательности под SEQ ID NO: 2)

участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 из последовательности под SEQ ID NO: 2); и

участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 из последовательности под SEQ ID NO: 2).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A с высокой аффинностью связываются с NKG2A человека и яванского макака и не связываются или с низкой аффинностью связываются с NKG2A отличного от примата животного, таким как NKG2A мыши или крысы. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

(a) характеризуются значением EC_{50} приблизительно 0,6 нМ или ниже для связывания с белком NKG2A человека, по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(b) характеризуются значением EC_{50} приблизительно 9,0 нМ или выше для связывания с белком NKG2C человека, по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(c) характеризуются значением IC_{50} приблизительно 1,0 нМ или ниже для уменьшения связывания и/или взаимодействия с белком NKG2A человека, по результатам измерения с помощью анализа блокирования клеток;

(d) связываются с белком NKG2A человека с K_D приблизительно 0,4 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(e) связываются с белком NKG2A человека с K_D приблизительно 61 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(f) связываются с белком NKG2A яванского макака с K_D приблизительно 1,0 нМ или ниже, по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(g) интернализируются при связывании с NKG2A-экспрессирующими клетками;

(h) увеличивают продуцирование гамма-интерферона (IFNγ); и/или

(i) причем период полужизни комплекса антитело к NKG2A:белок NKG2A составляет приблизительно 40 секунд или дольше.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A блокируют связывание и/или взаимодействие лиганда NKG2A (HLA-E у людей) с белком NKG2A человека. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

a) Антитело к NKG2A блокирует связывание пентамера HLA-E с клетками, экспрессирующими NKG2A человека, с IC_{50} приблизительно 0,30 нМ в случае NKL и с IC_{50} приблизительно 1,0 нМ в случае клеток CHO-hNKG2A;
b) Антитело к NKG2A в комплексе либо с HNKG2A-CD94-mFC, либо с белком NKG2A-CD94-mFc яванского макака блокирует связывание HLA-E человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A специфичны к NKG2A человека. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

a) характеризуются значением EC_{50} для связывания антитела к NKG2A с белком NKG2A человека, которое приблизительно в 15 раз меньше второго значения EC_{50} для связывания антитела к NKG2A с белком NKG2C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления значение EC_{50} для связывания антитела к NKG2A с NKG2A человека составляло приблизительно 0,6 нМ, тогда как значение EC_{50} для связывания антитела к NKG2A с NKG2C человека составляло приблизительно 9,0 нМ.

b) не имеют специфического связывания антитела к NKG2A с NKG2C человека по результатам SPR-анализа; и/или

c) не блокируют взаимодействие NKG2C человека и HLA-E по результатам измерения с помощью проточной цитометрии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A имеет инертный Fc (например, антитело относится к изотипу IgG1) для уменьшения или предупреждения связывания FcγR. Хотя и без привязки к какой-либо теории, поскольку NKG2A является ингибирующим рецептором, экспрессируемым на CD8+ T- и NK-клетках, снижение агонизма или истощение NKG2A+ CD8+ T- или NK-клеток даст полезный результат для противоопухолевой функции. Таким образом, блокирование взаимодействия NKG2A и HLA-E можно осуществить с помощью антитела к NKG2A, которое не взаимодействует с человеческими FcγR.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемое в настоящем документе антитело к NKG2A усиливает противоопухолевую функциональную активность Т-клеток. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

a) обращают ингибирование передачи NK-κB сигналов у NKG2A-экспрессирующей линии Т-клеток Jurkat, простимулированных посредством CHO/scOKT3/HLA-E, со значением EC_{50} приблизительно 0,2 нМ или ниже;

b) индуцируют выработку гамма-интерферона (IFN-γ) у $NKG2A^+$ CD8 Т-клеток, выделенных из PBMC здорового донора, совместно культивированных с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1;

c) индуцируют выработку IFN-γ у $NKG2A^+$ CD8 Т-клеток, выделенных из опухолей человека, совместно культивированных с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A усиливают противоопухолевую функциональную активность NK-клеток. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела к NKG2A характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

a) увеличивают продуцирование IFN-γ в NKL-клетках, совместно культивируемых с CHO/MICA/HLA-E;

b) индуцируют дозозависимое увеличение дегрануляции NK-клеток и лизис HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A интернализируются после связывания NKG2A-экспрессирующими клетками. В частности, в соответствии с некоторыми вариантами

осуществления, антитела к NKG2A характеризуются интернационализацией с EC_{50} приблизительно 0,5 нМ или ниже. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A характеризуются дозозависимой интернационализацией с EC_{50} приблизительно 0,5 нМ или ниже.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A по настоящему изобретению не имеют нарушений в последовательности, уменьшающих химическую стабильность антител. Антитела к NKG2A по настоящему изобретению имеют различные важные применения, например, для лечения и/или диагностики раковых и других нарушений, связанных с экспрессией и/или активностью NKG2A.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые в настоящем документе с помощью аминокислотной последовательности антитела к NKG2A связываются с конкретными эпитопами на NKG2A человека, как описано в примере 4.

Связывание с NKG2A человека можно оценить с помощью одной или нескольких методик, хорошо известных в настоящей области техники. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело протестировано с помощью анализа методом проточной цитометрии, в котором антитело вступает в реакцию с линией клеток, которые экспрессируют NKG2A человека, таких как клетки CHO, которые были подвергнуты трансфекции так, чтобы они экспрессировали NKG2A человека на своей клеточной поверхности. Дополнительно или альтернативно, связывание антитела, в том числе кинетику связывания (например, значение K_D) можно протестировать в анализах связывания Biacore. К еще одним подходящим анализам связывания относятся ELISA-анализы с применением, например, рекомбинатного белка NKG2A человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с белком NKG2A человека с высокой аффинностью, например, с наномолярной аффинностью, в том числе с K_D, равной 110^{-6} М или ниже, 1×10^{-7} М или ниже, 1×10^{-8} М или ниже, 1×10^{-9} М или ниже или 10^{-10} М или ниже.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к моноклональному антителу к NKG2A или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с эпитопом, расположенным в дискретных участках, содержащих следующие аминокислотные остатки, которые определены с помощью HDX-MS и/или картирования эпитопов методом FPOP:

участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 из последовательности под SEQ ID NO: 2 (природная аминокислотная последовательность hNKG2A);

участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 4: L (аминокислотный остаток 206 из последовательности под SEQ ID NO: 2); и

участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 из последовательности под SEQ ID NO: 2).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу к NKG2A или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с эпитопом, расположенным в дискретных участках, содержащих следующие аминокислотные остатки, которые определены с помощью HDX-MS:

участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 из последовательности под SEQ ID NO: 2); и

участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 из последовательности под SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A усиливают функцию NK-клеток путем блокирования NKG2A/HLA-E-опосредованного ингибирования. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело к NKG2A связывается с белком NKG2A человека и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, например, антиген-специфический ответ с участием Т-клеток и/или NK-клеток. Способность антитела к NKG2A стимулировать иммунный ответ можно протестировать путем измерения роста опухоли, например, в *in vivo* ксенотрансплантатной модели опухоли, как описано в настоящем документе в примерах. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела к NKG2A или их антигенсвязывающие части увеличивают продуцирование цитокинов (например, гамма-интерферона (IFN-γ)) у NKG2A-экспрессирующих Т-клеток и/или увеличивают пролиферацию Т-клеток, в том числе эффекторных Т-клеток и цитотоксических Т-клеток (также известных как $CD8^+$ Т-клетки).

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело к NKG2A или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NKG2A человека и характеризуются по меньшей мере одним из следующих свойств:

a) связываются с одним или несколькими из следующих остатков, которые определены с помощью HDX-MS и/или картирования эпитопов методом FPOP:

участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 из последовательности под SEQ ID NO: 2 (природная аминокислотная последовательность hNKG2A);

участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

участок 4: L (аминокислотный остаток 206 из последовательности под SEQ ID NO: 2); и

участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 из последовательности под SEQ ID NO: 2);

b) связываются с тем же эпитопом на NKG2A человека, что и антитела NKG2A.11 и 13F3.A4;

c) конкурируют за связывание с NKG2A человека с антителами к NKG2A.11 и 13F3.A4;

d) связываются с NK-клеткой человека с EC_{50} приблизительно 0,4 нМ по результатам измерения методом Biacore;

e) блокируют связывание NK-клеток человека с HLA-E с IC_{50} приблизительно 0,3 нМ по результатам измерения методом Biacore;

f) связываются с экспрессирующими NKG2A яванского макака клетками CHO с EC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже;

g) обладают низким связыванием с NKG2C человека с EC_{50} приблизительно 9,0 нМ или выше (другими словами, антитело к NKG2A не блокирует взаимодействие NKG2C человека с HLA-E); и/или

h) усиливают противоопухолевые ответы с участием CD8+ Т-клеток и NK-клеток. Например:

   i. увеличивают продуцирование IFN-γ в первичном анализе с применением T:CHO-OKT3-HLA-E-PDL1;

ii. увеличивает продуцирование IFN-γ в анализе с применением Т-клеточных противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (TIL):CHO-OKT3-HLA-E-PDL1; и/или

iii. увеличивает цитотоксичность и продуцирование IFN-γ в первичных анализах с применением NK-клеток.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к антителам к NKG2A по настоящему изобретению относятся гуманизированные и полностью человеческие моноклональные антитела. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела представляют собой, например, химерные моноклональные антитела.

a. Моноклональные антитела к NKG2A

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению представляют собой моноклональные антитела 13F3.A4, NKG2A.9 и NKG2A.11, которые выделены и охарактеризованы в отношении структуры так, как описано в представленных далее примерах. Аминокислотные последовательности VH и VL представлены в таблице последовательностей и Перечне последовательностей.

Учитывая, что каждое из данных антител может связываться с NKG2A человека, последовательности VH и VL можно «сочетать и комбинировать» для создания других связывающих молекул к hNKG2A по настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при сочетании и комбинировании цепей VH и VL последовательность VH из конкретной пары VH/VL заменяют на структурно схожую последовательность VH. Аналогично, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, последовательность VL из конкретной пары VH/VL заменяют на структурно схожую последовательность VL. Следовательно, согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с белком NKG2A человека, причем вариабельные участки легкой и тяжелой цепей содержат:

(a) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 9 и 8 соответственно;

(b) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 164 и 8 соответственно; или

(c) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 169 и 167 соответственно.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат различные CDR1, различные CDR2 и различные CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи из антител NKG2A.9, NKG2A.11 и 13F3A.4. Следовательно, согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с белком NKG2A человека, причем антитело содержат:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11, 12 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 154, 14 и 15 соответственно; или

(c) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий участок CDR1, CDR2 и CDR3, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 155, 14 и 15 соответственно.

Из уровня техники хорошо известно, что домен CDR3, независимо от домена(-ов) CDR1 и/или CDR2, сам по себе может определять специфичность связывания антитела с родственным антигеном, и что можно прогнозируемо получить множество антител со схожей специфичностью связывания на основе общей последовательности CDR3. (См., например, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000). Следовательно, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, содержащим один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела, полученного от человека или отличного от человека животного, причем моноклональное антитело способно специфически связываться с NKG2A человека. Согласно определенным аспектам, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, содержащим один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела отличного от человека животного, причем моноклональное антитело способно специфически связываться с NKG2A человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела по настоящему изобретению, содержащие один и/или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела отличного от человека животного, (a) способны конкурировать за связывание; (b) сохраняют функциональные характеристики; (c) связываются с одним и тем же эпитопом; и/или (d) имеют схожую аффинность связывания, что и у соответствующего исходного антитела отличного от человека животного.

Согласно другим аспектам, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, содержащим один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела человека, такого как, например, антитело человека, полученное от отличного от человека животного, причем антитело человека способно специфически связываться с NKG2A человека. Согласно другим аспектам, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, содержащим один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из первого антитела человека, такого как, например, антитело человека, полученное от отличного от человека животного, причем первое антитело человека способно специфически связываться с NKG2A человека, и причем домен CDR3 из первого антитела человека заменяет домен CDR3 в антителе человека, которое не обладает специфичностью связывания с NKG2A, с получением второго антитела человека, которое обладает специфичностью связывания с NKG2A человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела по настоящему изобретению, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из первого антитела человека, (a) способны конкурировать за связывание; (b) сохраняют функциональные характеристики; (c) связываются с одним и тем же эпитопом; и/или (d) обладают такой же аффинностью связывания, что и соответствующее исходное антитело отличного от человека животного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к hNKG2A с IgG1.3 человека с инертным Fc в качестве определяющего изотип остова. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела к hNKG2A с инертным Fc характеризуются превосходной эффективностью при лечении рака в сравнении с другими изотипами.

b. Антитела с консервативными модификациями

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к NKG2A по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе описываемых в настоящем документе антител (например, антител 13F3.A4, NKG2A.9 и NKG2A.11) или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к hNKG2A по настоящему изобретению. В настоящей области техники известно, что можно произвести определенные консервативные модификации в последовательности, которые не устранят связывание с антигеном. (См., например, Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8). Следовательно,

настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем:

(a) вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12, или ее консервативные модификации; и

(b) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывают NKG2A человека.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления, антитело обладает одним или несколькими функциональными свойствами, описанными в настоящем документе, такими как высокая аффинность связывания с NKG2A человека и/или способность блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, или ее консервативные модификации; а вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14, или ее консервативные модификации. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, или ее консервативные модификации; а вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID соответственно: 13, 154 или 155, или ее консервативные модификации.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело к NKG2A представляет собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

c. Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к hNKG2A

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с тем же эпитопом на белке NKG2A человека, что и любое из моноклональных антител к hNKG2A по настоящему изобретению (т. е. к антителам, которые обладают способностью перекрестно конкурировать за связывание с

белком NKG2A человека с любым из моноклональных антител по настоящему изобретению). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эталонными антителами для исследований перекрестной конкуренции являются моноклональные антитела NKG2A.9, NKG2A.11 и 13F3.A4 в стандартных анализах связывания NKG2A человека. Например, можно применять стандартные анализы ELISA, в ходе которых белок рекомбинантного NKG2A человека иммобилизируют на планшете, одно из антител метят флуоресцентной меткой и оценивают способность немеченных антител конкурировать с меченным антителом за связывание. Дополнительно или альтернативно, можно использовать анализ Biacore для оценки способности антител перекрестно конкурировать. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание, например, NKG2A.9, NKG2A.11 и/или 13F3.A4 с NKG2A человека свидетельствует о том, что тестируемое антитело может конкурировать с NKG2A.9, NKG2A.11 и/или 13F3.A4 за связывание с NKG2A человека, а значит связывается с тем же самым эпитопом на NKG2A человека, что и NKG2A.9, NKG2A.11, и/или 13F3.A4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, которое связывается с тем же эпитопом на NKG2A человека, что и NKG2A.9, NKG2A.11 и/или 13F3.A4, представляет собой гуманизированное или человеческое моноклональное антитело.

Как рассмотрено далее в примере 4, связывание NKG2A.9 и 13F3.A4 было картировано для конкретных остатков. Следовательно, в соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем при связывании с белком NKG2A человека антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS):

(e) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(f) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(g) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158); и

(h) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159),

причем моноклональное антитело блокирует связывание лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем при связывании с NKG2A человека моноклональное антитело специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом

HDX-MS и/или путем картирования эпитопов методом быстрого фотохимического окисления белков (FPOP):

(f) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(g) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(h) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158);

(i) L; и

(j) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159),

причем моноклональное антитело блокирует связывание лиганда NKG2A (например, HLA-E у людей) с белком NKG2A человека.

Такие гуманизированные или человеческие моноклональные антитела можно получить и выделить так, как описано в настоящем документе. Например, антитела к hNKG2A, которые связываются с такими же или схожими эпитопами для описываемых в настоящем документе антител, можно получить с использованием протоколов иммунизации, например, описываемых в настоящем документе. Полученные антитела можно подвергнуть скринингу на предмет связывания с высокой аффинностью с NKG2A человека. Выбранные антитела можно затем изучить, например, в анализе с использованием дрожжевого дисплея, в котором варианты последовательности hNKG2A представлены на поверхности дрожжевых клеток, или в экспериментах по водородно-дейтериевому обмену и/или FPOP, для определения точного эпитопа, связываемого антителом.

Определение эпитопа можно производить любым способом, известным из уровня техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления считают, что антитела к hNKG2A связываются с тем же эпитопом, что и раскрываемые в настоящем документе mAb к hNKG2A, если они образуют контакты с одним или несколькими из тех же остатков по меньшей мере в одном участке hNKG2A; если они образуют контакты с большинством остатков по меньшей мере в одном участке hNKG2A; если они образуют контакты с большинством остатков в каждом участке hNKG2A; если они образуют контакты с большинством контактов по всей длине hNKG2A; если они образуют контакты во всех тех же отдельных участках hNKG2A; если они образуют контакты со всеми остатками в каком-либо одном участке hNKG2A; или если они образуют контакты со всеми теми же остатками во всех тех же участках. «Участки» эпитопа представляют собой кластеры остатков вдоль, но не обязательно непосредственно смежно с первичной последовательностью.

Методики определения антител, которые связываются с «одним и тем же эпитопом на hNKG2A» с описываемыми в настоящем документе антителами, включают рентгенографический анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который

обеспечивает атомное разрешение эпитопа. С помощью других способов отслеживают связывание антитела с фрагментами антигена или мутантными вариациями антигена, причем утрата связывания вследствие аминокислотной модификации в антигенной последовательности указывает на эпитопный компонент. Способы также могут быть основаны на способности представляющего интерес антитела аффинно выделять специфически короткие пептиды (либо в нативной трехмерной форме, либо в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек на основе фагового дисплея или в результате протеазного гидролиза целевого белка. Затем такие пептиды считают ориентирами для определения эпитопа, соответствующего антителу, применяемому для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, позволяют картировать конформационные эпитопы прерывистого типа.

Эпитоп или участок, содержащий эпитоп, также можно идентифицировать, например, посредством скрининга в отношении связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих NKG2A. В качестве альтернативы можно применять способ по Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899 для направления отбора антител, имеющих одинаковый эпитоп и, следовательно, свойства, схожие с описываемыми в настоящем документе антителами к NKG2A. С помощью фагового дисплея сначала тяжелую цепь антитела к NKG2A спаривают с репертуаром (например, человеческих) легких цепей для отбора NKG2A-связывающего антитела, а затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром (например, человеческих) тяжелых цепей для отбора (например, человеческого) NKG2A-связывающего антитела, имеющего такой же эпитоп или участок эпитопа, что и описываемое в настоящем документе антитело к NKG2A. Альтернативно, описываемые в настоящем документе варианты антитела можно получить с помощью мутагенеза кДНК-последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи антитела.

Сканирующий аланином мутагенез, описанный в работе Cunningham & Wells, *Science* 244: 1081 (1989), или любую другую форму точечного мутагенеза аминокислотных остатков в NKG2A также можно использовать для определения функционального эпитопа для антитела к NKG2A.

Эпитоп или участок эпитопа («участок эпитопа» представляет собой участок, содержащий эпитоп или перекрывающийся с эпитопом), связываемые специфическим антителом, также можно определить путем оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты NKG2A. Набор перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательности NKG2A (например, NKG2A человека), можно синтезировать и подвергнуть скринингу на предмет связывания, например, в прямом ELISA, конкурентном

ELISA (где пептид оценивают по его способности предупреждать связывание антитела с NKG2A, связанным с лункой микротитрационного планшета) или на чипе. Такие способы скрининга пептидов не всегда могут позволить детектировать некоторые функциональные эпитопы прерывистого типа, т. е. функциональные эпитопы, которые включают аминокислотные остатки, которые не являются смежными на первичной последовательности полипептидной цепи NKG2A.

Эпитоп также можно идентифицировать с помощью MS-футпринтинга белков, такого как HDX-MS и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). HDX-MS можно проводить, например, так, как дополнительно описано у Wei *et al.* (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, причем такие способы специально включены в настоящее описание посредством ссылки. FPOP можно проводить так, как описано, например, в работе Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, причем такие способы специально включены в настоящее описание посредством ссылки.

Эпитоп, связываемый антителами к NKG2A, также можно определить с помощью структурных способов, таких как определение рентгеновской кристаллической структуры (например, WO2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия на основе ядерного магнитного резонанса (NMR), включая NMR-определение скоростей обмена H-D подвижных амидных водородов в NKG2A, когда они находятся в свободном состоянии и когда они связаны в комплексе с представляющим интерес антителом (Zinn-Justin *et al.* (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin *et al.* (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Если не указано иное и с привязкой к формуле изобретения, связываемый антителом эпитоп является эпитопом, определяемым с помощью способов HDX-MS.

Антитела к NKG2A, которые связываются с высокой аффинностью

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к hNKG2A по настоящему изобретению связываются с hNKG2A с высокой аффинностью, что делает их эффективными терапевтическими средствами. В соответствии с различными вариантами осуществления, антитела к hNKG2A по настоящему изобретению связываются с hNKG2A с K_D менее 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 300 пМ или 100 пМ. К стандартным анализам оценки способности антител связываться с hNKG2A относятся ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, интерферометрия слоя биомолекул (BLI) и SPR-анализ Biacore™ (см. пример 10).

d. Варианты последовательностей антител к NKG2A

Раскрываемые в настоящем документе варианты последовательностей антител к NKG2A сохраняют требуемые функциональные свойства, которые раскрыты в настоящем

документе. Если не указано иное, CDR-участки обозначены с помощью системы Kabat (Kabat, *et al.*, 1991). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к человеческим или гуманизированным антителам к hNKG2A, содержащим последовательности CDR, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичны последовательностям CDR раскрываемых в настоящем документе антител. Настоящее изобретение также относится к антителам к hNKG2A, содержащим последовательности вариабельных доменов тяжелой и/или легкой цепей, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичны последовательностям вариабельных доменов тяжелой и/или легкой цепей раскрываемых в настоящем документе антител, а также к антителам к hNKG2A, содержащим полноразмерные последовательности тяжелой и/или легкой цепей, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичны последовательностям тяжелой и/или легкой цепей раскрываемых в настоящем документе антител.

II. Сконструированные и модифицированные антитела

a. V_H и V_L участки

Также настоящее изобретение относится к сконструированным и модифицированным антителам, которые можно получить с помощью антитела, имеющего одну или несколько раскрываемых в настоящем документе последовательностей V_H и/или V_L, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем такое модифицированное антитело может иметь измененные свойства относительно исходного антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемое в настоящем документе антитело сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одном или обоих вариабельных участках (т. е. V_H и/или V_L), например, в пределах одного или нескольких CDR-участков и/или в пределах одного или нескольких каркасных участков. Дополнительно или альтернативно, раскрываемое в настоящем документе антитело было сконструировано путем модификации остатков в пределах константного участка(константных участков), например, для изменения эффекторной функции(эффекторных функций) антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления конструирование вариабельного участка включает прививание CDR. Такое прививание особенно полезно при гуманизации антител отличного от человека животного к NKG2A, например, антител к HNKG2A, которые конкурируют за связывание с раскрываемыми в настоящем документе антителами к hNKG2A и/или связываются с тем же эпитопом, что и избранные антитела к hNKG2A,

раскрываемые в настоящем документе. Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в CDR тяжелых и легких цепей. CDR являются гипервариабельными в последовательности и/или образуют петли с определенной структурой («гипервариабельные петли»). Векторы экспрессии можно сконструировать таким образом, чтобы они включали последовательности CDR из конкретного эталонного (также называемого «исходным») антитела, привитые на каркасные последовательности из другого антитела (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.* См. *U.S.A.* 86:10029-10033; патент США № 5225539, за авторством Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, за авторством Queen и соавт.). В некоторых случаях полученное рекомбинантное антитело обладает свойствами, аналогичными исходному антителу. Затем сконструированное антитело можно дополнительно модифицировать для придания свойств, отличных от исходного антитела. В других случаях прививание последовательностей исходных CDR на каркасную цепь позволяет устранить определенные характеристики исходного антитела, так чтобы рекомбинантное антитело более не имело данных характеристик. Одной из иллюстративных характеристик является аффинность связывания по отношению к антигену. В таких случаях может быть преимущественным дополнительно модифицировать сконструированное антитело для восстановления требуемых характеристик исходного антитела.

Такие каркасные последовательности можно получить из общедоступной базы данных ДНК или опубликованных источников, которые включают последовательности генов антитела эмбрионального типа. Например, последовательности ДНК эмбрионального типа для генов вариабельных участков тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных последовательностей эмбрионального типа человека «VBase» в Kabat, E. A., *et al.*, 1991); 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" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и в работе 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; содержание каждой из которых определенно включено в настоящий документ посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каркасными последовательностями для применения в описываемых в настоящем документе антителах являются последовательности, которые схожи по структуре с каркасными последовательностями, используемыми описанными в настоящем документе антителами. Последовательности CDR1, 2 и 3 в V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 в V_L можно

привить на каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную той, что встречается в гене иммуноглобулина эмбрионального типа, из которой происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно привить на каркасные участки, которые содержат до 20 аминокислотных замен, включая консервативные аминокислотные замены по сравнению с последовательностями эмбрионального типа. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях полезно подвергнуть мутации остатки в каркасных участках для сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США № 5530101, № 5585089, № 5693762 и № 6180370, за авторством Queen и соавт.).

К описываемым в настоящем документе сконструированным антителам относятся антитела, в которых были произведены модификации в каркасных остатках в пределах V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела, например, для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в том, чтобы «подвергнуть возвратной мутации» один или несколько каркасных остатков в соответствующую последовательность эмбрионального типа. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности эмбрионального типа, от которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями эмбрионального типа, от которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных участков в их конфигурацию эмбрионального типа соматические мутации можно «подвергнуть возвратной мутации» в последовательность эмбрионального типа, например, путем сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Такие «подвергнутые возвратной мутации» антитела также включены в настоящее раскрытие.

Другой тип модификации каркасной последовательности включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в пределах одного или нескольких CDR-участков для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы таким образом уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называют «деиммунизацией», и более подробно он описан в патентной публикации США № 20030153043 Carr *et al.*

Другим типом модификации вариабельного участка является мутация аминокислотных остатков в CDR-участках для улучшения одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) у представляющего интерес антитела. Для введения мутации(мутаций) можно осуществить сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез и воздействия на связывание антитела или другое

представляющее интерес функциональное свойство. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Мутации могут быть аминокислотными добавлениями, делециями или заменами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в CDR-участке изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

Метиониновые остатки в CDR антител могут быть окислены, что приводит в результате к потенциальной химической деградации и последующему снижению эффективности антитела. Следовательно, настоящее изобретение также относится к антителам к NKG2A, которые содержат один или несколько метиониновых остатков в CDR тяжелых и/или легких цепей, замещенных аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительной деградации. Аналогичным образом можно удалить сайты дезамидирования из антител к NKG2A, особенно в CDR. Настоящее изобретение также относится к антителам, в которых потенциальные сайты гликозилирования в антигенсвязывающем домене были удалены для предупреждения гликозилирования, которое может препятствовать связыванию антигена. См., например, патент США № 5714350.

b. Маскировка антител

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые в настоящем документе антитела модифицируют так, чтобы ограничить их связывание с конкретными клетками и/или тканями. В соответствии с одним вариантом осуществления такие антитела содержат блокирующую пептидную «маску», которая специфически связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связыванию антигена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такая маска присоединена к каждому из связывающих плеч антитела посредством расщепляемым протеазой линкера. См., например, патент США № 8518404, выданный CytomX. Антитела с расщепляемыми протеазой линкерами пригодны для лечения различных форм рака, при которых уровни протеаз значительно увеличены в опухолевом микроокружении по сравнению с неопухолевыми тканями. Избирательное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет произойти диссоциации маскирующего/блокирующего пептида, что позволяет антигену избирательно связываться в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

В соответствии с другим вариантом осуществления разработано двухвалентное связывающееся соединение («маскирующий лиганд»), содержащее два антигенсвязывающих домена, которое связывается с обеими антигенсвязывающими

поверхностями (двухвалентного) антитела и препятствует связыванию антигена. В соответствии с одним вариантом осуществления две связывающих доменных маски соединены друг с другом (но не с антителом) при помощи расщепляемого линкера, например, расщепляемого пептидазой. (См., например, WO 2010/077643, Tegopharm Corp). Маскирующие лиганды могут содержать или быть получены из антигена, с которым антитело должно связываться, или могут быть созданы независимо (например, связывающие фрагменты к определенному идиотипу). Такие маскирующие лиганды пригодны для лечения различных форм рака, при которых уровни протеаз значительно увеличены в опухолевом микроокружении по сравнению с неопухолевыми тканями. Избирательное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет произойти диссоциации двух связывающих доменов друг от друга, уменьшая авидность антигенсвязывающих поверхностей антитела. Происходящая в результате диссоциация маскирующего лиганда от антитела делает возможным избирательное связывание антигена в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

c. Fc-участки и модифицированные Fc-участки

В соответствии с одним вариантом осуществления раскрываемые в настоящем документе антитела могут содержать Fc-участки, выбранные на основе биологической активности антитела. Salfeld, *Nat. Biotechnol.* 25:1369 (2007). Например, IgG человека можно разделить на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждый из данных подклассов содержит Fc-участок, имеющий уникальный профиль связывания с одним или несколькими рецепторами Fcγ (активирующими рецепторами FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32a,c); FcγRIIIA и FcγRIIIB (CD16a,b) и ингибирующим рецептором FcγRIIB (CD32b), а также с первым компонентом комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми рецепторами Fcγ; IgG2 связывается с $FcγRIIA_{H131}$ и с более низкой аффинностью с $FcγRIIA_{R131}$, $FcγRIIIA_{V158}$; IgG4 связывается с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC и $FcγRIIIA_{V158}$; а ингибирующий рецептор FcγRIIB имеет более низкую аффинность к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все остальные рецепторы Fcγ. (Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113:3716). Из результатов исследований видно, что FcγRI не связывается с IgG2, а FcγRIIIB не связывается с IgG2 или IgG4. См. там же. В целом, что касается ADCC-активности, у человека IgG1 ≧ IgG3 ≫ IgG4 ≧ IgG2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выбирают константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, например, для применения в терапевтической композиции, поскольку необходима ADCC.

Вариабельные участки описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A можно соединить (например, ковалентно связать или слить) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может быть любого аллотипа или изоалотипа, например, в случае IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); for IgG2: G2m, G2m23(n); for 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). (См., например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1). На выбор аллотипа могут влиять потенциальные проблемы иммуногенности, например, для минимизации образования антител к лекарственному средству.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к NKG2A по настоящему изобретению не могут взаимодействовать с человеческими FcγR. Поскольку NKG2A является ингибирующим рецептором, экспрессируемым на CD8+ T- и NK-клетках, устранение или снижение агонизма или истощения NKG2A+ CD8+ T- или NK-клеток усиливает противоопухолевый иммунитет. Поэтому была необходима блокировка взаимодействия NKG2A/HLA-E с помощью антитела к NKG2A, неспособного взаимодействовать с человеческими FcγR.

d. Продление периода полужизни

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A модифицировано для увеличения его биологического периода полужизни, например, периода полужизни антитела в сыворотке. Из уровня техники известны различные подходы. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело изменено в пределах участка CH1 или CL так, чтобы оно содержало связывающий рецептор реутилизации эпитоп, взятый из двух петель домена CH2 из Fc-участка IgG, как описано в патентах США № 5869046 и № 6121022, Presta *et al.* Например, почти в четыре раза период полужизни увеличивает комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E. (Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514). Другие модификации для увеличения связывания FcRn описаны в Yeung *et al.* (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6277375; 6821505; WO 97/34631; WO 2002/060919.

Период полужизни в сыворотке описываемых в настоящем документе антител также можно увеличить путем пегилирования. Антитело можно пегилировать, например, для увеличения биологического периода полужизни (например, в сыворотке) антитела. Для того, чтобы пегилировать антитело, антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолевым (PEG) реагентом, таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG, в условиях, при

которых одна или несколько групп PEG присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно, пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Применяемый в контексте настоящего документа термин «полиэтиленгликоль» предназначен для охвата любой из форм PEG, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно(C1-C10)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеимид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подлежащее пегилированию антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны из уровня техники и могут быть применимы к описанным в настоящем документе антителам. (См., например, EP 0154316, Nishimura и соавт. и EP 0401384, Ishikawa и соавт.)

В некоторых случаях может быть необходимо уменьшить период полужизни антитела, а не увеличить его. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела включают модификации, уменьшающие их период полужизни. Такие модификации, как I253A (Hornick *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R, I253A or H310A (Kim *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) в Fc IgG1 человека могут уменьшать связывание с FcRn, тем самым уменьшая период полужизни (увеличивая клиренс), для применения в ситуациях, когда предпочтительным является быстрый клиренс, например, при медицинской визуализации. (См. также Kenanova *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:622). Другие способы улучшения клиренса предусматривают придание антигенсвязывающим доменам по настоящему изобретению формата фрагментов антител, не обладающих способностью связывать FcRn, таких как Fab-фрагменты. Такая модификация может, например, уменьшить период полужизни антитела в кровотоке от пары недель до нескольких часов. При необходимости затем можно использовать избирательное пегилирование фрагментов антител для увеличения периода полужизни фрагментов антитела. (Chapman *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780). Для увеличения периода полужизни фрагменты антител также можно слить с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкции слитого белка. (Yeh *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904). Альтернативно, можно построить биспецифическое антитело с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA). (См. WO 2009/127691, а также упомянутые в ней ссылки на патенты). Альтернативно, для увеличения периода полужизни к фрагментам антител можно добавить специализированные полипептидные последовательности, например, полипептидные

последовательности «XTEN». (Schellenberger *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; публикация международной патентной заявки WO 2010/091122).

e. Дополнительные варианты Fc

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при использовании константного домена IgG1 потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнире конструкций IgG1 можно удалить с помощью модификаций D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела. (WO 2014/043344).

Аффинности и свойства связывания у варианта Fc к его лигандам (рецепторам Fc) можно определить с помощью различных способов анализа *in vitro* (например, биохимических или иммунологических анализов), известных из уровня техники, включая без ограничения равновесные способы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA)) или кинетические способы (например, SPR-анализ BIACORE®) и другие способы, такие как непрямые анализы связывания, анализы конкурентного ингибирования, метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут предусматривать использование метки на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использование различных способов детекции, включая без ограничения хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в работе Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), которая фокусируется на взаимодействиях антитела и иммуногена.

В соответствии с еще одними вариантами осуществления, для увеличения или уменьшения эффекторной функции модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получить агликозированное антитело, которое не обладает всей эффекторной функцией, путем мутации консервативного аспарагинового остатка в положении 297 (например, N297A), тем самым исключая связывание комплемента и FcγRI. (Bolt *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403; см. также Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (в которой применяют N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297)).

Хотя агликозилированные антитела обычно не обладают эффекторной функцией, для восстановления этой функции можно ввести мутации. Агликозилированные антитела, например, полученные в результате мутаций N297A/C/D/или H или продуцируемые в системах (например, *E. coli*), которые не гликозилируют белки, можно подвергнуть дополнительным мутациям для восстановления связывания FcγR, например, S298G, и/или

T299A/G/или H (WO 2009/079242), или E382V и M428I (Jung *et al.* (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107:604).

Также можно применять гликоинженерию для модификации противовоспалительных свойств конструкции IgG путем изменения содержания α2,6-сиалила углеводных цепей, присоединенных в Asn297 Fc-участков, где повышенная доля α2,6-сиалированных форм приводит в результате к усилению противовоспалительных эффектов. (См. Nimmerjahn *et al.* (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513). Напротив, уменьшение доли антител, имеющих α2,6-сиалилированные углеводы, может быть полезным в случаях, когда не нужны противовоспалительные свойства. Способы модификации содержания α2,6-сиалила у антител, например, путем избирательной очистки α2,6-сиалированных форм или путем ферментативной модификации, приведены в публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0206246. В соответствии с другими вариантами осуществления аминокислотную последовательность из Fc-участка можно модифицировать так, чтобы имитировать эффект α2,6-сиалирования, например, путем включения модификации F241A. (WO 2013/095966).

III. Физические свойства антител

В соответствии с определенными вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела содержат один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельном участке либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут привести к повышенной иммуногенности антитела или к измененной фармакокинетике антитела из-за изменения связывания антигена (Marshall et al (1972) *Ann. 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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A не содержит гликозилирования вариабельного участка. Такие антитела можно получить путем отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельном участке, либо путем мутирования остатков в участке гликозилирования.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела не содержат сайты изомерии аспарагина. Дезамидирование аспарагина происходит на последовательностях N-G или D-G и приводит к образованию изоаспарагиновой кислоты, что вносит излом в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (явление, известное как эффект изоаспарагиновой кислоты).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела характеризуются изоэлектрической точкой (pI) в дипазоне pH от 6 до 9,5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела характеризуются pI в диапазоне pH 7-9,5 или 6-8. Антитела с pI в пределах требуемого диапазона pI можно получить либо путем отбора антител с pI в диапазоне pH из группы кандидатов, либо путем мутации заряженных поверхностных остатков конкретного антитела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела отбирают и/или конструируют такими, чтобы они имели температуру начального развертывания (T_{M1}) более 60°C, более 65°C или более 70°C. Температуру плавления можно измерить с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett.* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела отбирают и/или конструируют такими, чтобы они обладали полезными свойствами деградации, например, медленной деградации *in vitro* и/или *in vivo*. Деградацию антитела можно измерить с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem.* 67:3626-32). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела отбирают и/или конструируют такими, чтобы они обладали благоприятными агрегационными свойствами, например, антитела, у которых наблюдается минимальная агрегация *in vitro* и/или *in vivo*, которая может вызвать нежелательный иммунный ответ и/или измененные или неблагоприятные фармакокинетические свойства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела характеризуются агрегацией 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее или 5% или менее по сравнению с агрегацией исходного антитела. Агрегацию можно измерить несколькими методиками, включая колонку эксклюзионную колоночную (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) и светорассеяние.

IV. Молекулы нуклеиновой кислоты и рекомбинантные способы

Другой описываемый в настоящем документе аспект относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, например, в клетке-хозяине, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновую кислоту «выделяют» или «делают практически чистой» при очистке

от других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, с помощью стандартных методик, включая щелочную/SDS обработку, CsCl-бэндинг, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области методики. (См. F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York). Описываемая в настоящем документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интроны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Описываемые в настоящем документе нуклеиновые кислоты можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как дополнительно описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и/или тяжелые цепи антитела, производимые гибридомой, можно получить с помощью стандартных методик ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. В случае антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с помощью методик фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделить из библиотеки.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты V_H и V_L, эти фрагменты ДНК можно подвергнуть дополнительным манипуляциям с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов вариабельных участков в гены полноразмерной цепи антитела, гены Fab-фрагментов или ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий V_L или V_H, функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константный участок антитела или гибкий линкер. Термин «функционально связанный», применяемый в настоящем контексте, означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, чтобы аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, оставались в одной рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую участок V_H, можно преобразовать в ген полноразмерной тяжелой цепи посредством функционального связывания ДНК, кодирующей V_H, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константного участка тяжелой цепи человека известны из уровня техники (см. например, Kabat, *et al.*, 1991), а

фрагменты ДНК, охватывающие такие участки, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA, IgE, IgM или IgD, например, участок IgG1. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента, ДНК, кодирующую V_H, можно функционально связать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константный участок CH1 тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую участок V_L, можно преобразовать в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_L, с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи, т. е. CL. Последовательности генов константных участков легкой цепи человека известны из уровня техники (см., например, Kabat, *et al.*, 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), а фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа или лямбда.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие V_H и V_L, функционально соединяют с другими фрагментами, кодирующими гибкий линкер, например, кодирующими аминокислотную последовательность $(Gly_4\text{-}Ser)_3$ (SEQ ID NO: 160), так чтобы последовательности V_H и V_L могли экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка с участками V_L и V_H, соединенными гибким линкером (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).

V. Получение антитела

Различные антитела по настоящему изобретению, например, такие, которые связываются с тем же эпитопом, что и раскрываемые в настоящем документе выбранные антитела к hNKG2A, можно получить с помощью множества известных методик, таких как стандартная методика гибридизации соматических клеток, описанная в работе Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Также можно использовать и другие методики получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию B-лимфоцитов, методику фагового дисплея с применением библиотек генов антитела человека.

Иллюстративной животной системой для получения гибридом является мышиная система. Получение гибридомы у мышей является хорошо зарекомендовавшей себя процедурой. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных

спленоцитов для слияния известны из уровня техники. Также известны партнеры по слиянию (например, мышиные клетки миеломы) и процедуры слияния.

Описанные в настоящем документе химерные или гуманизированные антитела можно получить на основе последовательности мышиного моноклонального антитела, полученного так, как описано выше. ДНК, кодирующую иммуноглобулины с тяжелой и легкой цепями, можно получить из представляющей интерес мышиной гибридомы и сконструировать так, чтобы она содержала отличные от мышиных (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина, с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышиные вариабельные участки можно соединить с человеческими константными участками с помощью способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 4816567, за авторством Cabilly и соавт.). Для создания гуманизированного антитела мышиные CDR-участки можно вставить в человеческий каркас с помощью способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 5225539, за авторством Winter, и патенты США № 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370, за авторством Queen и соавт.).

В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе антитела являются моноклональными антителами человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против NKG2A человека, можно получить с помощью трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы, вместо мышиной системы. К таким трансгенным и трансхромосомным мышам относятся мыши, которые в настоящем документе называют соответственно мышами HuMAb и мышами KM, а совместно в настоящем документе их называют «мышами с Ig человека».

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неперестроенные последовательности тяжелых (μ и γ) и легких κ цепей иммуноглобулина человека, вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепи μ и κ (см., например, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Следовательно, такие мыши характеризуются уменьшенной экспрессией IgM или κ мыши, и в ответ на иммунизацию внесенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению класса и соматической мутации с получением высокоаффинного моноклонального антитела IgGκ человека (Lonberg, N. *et al.* (1994), выше; обзор приведен в работе 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 геномных модификаций, переносимых такими мышами, дополнительно описаны в работе 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) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; и в работе Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, содержание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки в полном его объеме. (См. также патенты США №№ 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 и 5770429; все за авторством Lonberg и Kay; патент США № 5545807, за авторством Surani и соавт.; PCT-публикации №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все за авторством Lonberg и Kay; и PCT-публикацию № WO 01/14424, за авторством Korman и соавт.)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела вырабатываются мышью, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе «мышами KM», подробно описаны в PCT-публикации WO 02/43478 за авторством Ishida и соавт.

Кроме того, в настоящей области техники доступны альтернативные трансгенные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, и их можно применять для продуцирования описываемых в настоящем документе антител к hNKG2A. Например, можно применять альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598, 6075181, 6114598, 6150584 и 6162963, за авторством Kucherlapati и соавт.

Более того, в настоящей области техники доступны альтернативные трансхромосомные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, и их можно применять для продуцирования описываемых в настоящем документе антител к NKG2A. Например, можно применять мышей, несущих как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, их называют «мышами TC»; такие мыши описаны в работе Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, в предшествующем уровне техники были описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелых и легких цепей человека (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), и их можно применять для продуцирования описываемых в настоящем документе антител к hNKG2A.

К дополнительным описанным в уровне техники мышиным системам для продуцирования антител человека, например, человеческих антител к hNKG2A, относятся (i) мышь VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), в которой были заменены эндогенные мышиные вариабельные участки тяжелой и легкой цепей посредством гомологичной рекомбинации на человеческие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными мышиными константными участками, с тем, чтобы у мышей продуцировались химерные антитела (V человека/C мыши), а затем их последовательно преобразуют в полностью человеческие антитела с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), при этом такая мышь содержит неперестроенные человеческие вариабельные участки тяжелой цепи, но один общий перестроенный человеческий вариабельный участок легкой цепи. Такие мыши и их применение для продуцирования 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.

Описываемые в настоящем документе моноклональные антитела также можно получить с помощью способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека известны из уровня техники. (См., например, патенты США №№ 5223409, 5403484 и 5571698, за авторством Ladner и соавт.; патенты США № 5427908 и № 5580717, за авторством Dower и соавт.; патенты США № 5969108 и № 6172197, за авторством McCafferty и соавт.; и патенты США №№ 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081, за авторством Griffiths и соавт.)

Описываемые в настоящем документе моноклональные антитела человека также можно получить с помощью мышей с тяжелым комбинированным иммунодифицитом (SCID), в которых были воспроизведены иммунные клетки человека с тем, чтобы при иммунизации индуцировался ответ с выработкой антител человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и № 5698767, за авторством Wilson и соавт.

Иммунизация

Для получения полностью человеческих антител к NKG2A человека мышей или трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены иммуноглобулина человека (например, мышей HCo12, HCo7 или KM), можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена NKG2A и/или клеток, экспрессирующих NKG2A, как описано для других антигенов, например, в работах Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 и WO 98/24884.

Альтернативно, мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей NKG2A человека. Предпочтительно, мыши будут иметь возраст 6-16 недель на момент первой инфузии. Например, для внутрибрюшинной иммунизации мышей можно применять очищенный или обогащенный препарат (5 мкг - 50 мкг) рекомбинантного антигена NKG2A. Если иммунизация с применением очищенного или обогащенного препарата антигена NKG2A не дает в результате антитела, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими NKG2A, например, клеточной линией, для стимуляции иммунных ответов.

Трансгенные мыши HuMAb лучше всего отвечают, если первоначально они были иммунизированы внутрибрюшинно или подкожно (SC) антигеном в адъюванте Риби, а затем раз в две недели посредством IP/SC иммунизаций (до 10 раз) антигеном в адъюванте Риби. Иммунный ответ можно отслеживать на протяжении протокола иммунизации, при этом образцы плазмы получают из образцов ретроорбитальной крови. Плазму можно подвергнуть скринингу с помощью ELISA и FACS (как описано ниже), а для слияний можно применять мышей с достаточными титрами человеческого иммуноглобулина к NKG2A. Мышей можно внутривенно бустировать антигеном за трое суток до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Для каждой иммунизации можно проводить от двух до трех слияний. Каждым антигеном можно иммунизировать от 6 до 24 мышей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления применяют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, как трансген HCo7, так и трансген HCo12 можно размножить вместе в одной мыши, имеющей два различных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к белку NKG2A

Для получения гибридом, продуцирующих описываемые в настоящем документе моноклональные антитела, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей можно выделить и слить с соответствующей иммортализованной линией клеток, такой как линия клеток миеломы мыши. Полученные в результате гибридомы можно подвергнуть скринингу для получения антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки у иммунизированных мышей можно слить с Sp2/0 несекретирующими клетками миеломы мыши (ATCC, CRL 1581) с 50% PEG. Клетки высевают в количестве примерно 2×10^5 в плоскодонный микротитрационный планшет с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей 10% фетальной клон-сыворотки, 18% кондиционированной среды «653», 5% Origen (IGEN), 4 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанола, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл

стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1× HAT (Sigma). Примерно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменен на HT. Затем индивидуальные лунки можно подвергнуть скринингу с помощью ELISA в отношении моноклональных антител IgM и IgG человека. После появления экстенсивного роста гибридомы среду обычно можно проверить спустя 10-14 суток. Секретирующие антитела гибридомы можно пересеять, снова подвергнуть скринингу и, если они все еще положительны по IgG человека, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды путем ограничения разведения. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антител в среде для культивирования тканей для изучения их свойств.

Для очистки моноклональных антител выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно профильтровать и сконцентрировать перед аффинной хроматографией на сефарозе с белком A (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Для того, чтобы убедиться в степени чистоты, элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор можно заменить на PBS, а концентрацию можно определить по OD280 с помощью коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разбить на аликвоты и хранить при -80°C.

VI. Производство антител

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к NKG2A

Антитела по настоящему изобретению, включая как специфические антитела, для которых приведены последовательности, так и другие родственные антитела к NKG2A, можно получить в трансфектоме клетки-хозяина с применением, например, комбинации методик рекомбинантной ДНК и способов генной трансфекции, известных из уровня техники (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов таких антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК с применением гибридомы, которая экспрессирует представляющее интерес антитело) и такие ДНК можно вставить в векторы экспрессии так, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями для регуляции транскрипции и трансляции. В данном контексте термин «функционально связанный» подразумевают как означающий, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, чтобы последовательности для регуляции транскрипции и трансляции в таком векторе выполняли

их предполагаемую функцию регулировки транскрипции и трансляции гена антитела. Векторы экспрессии и последовательности для регуляции экспрессии выбирают такие, чтобы они были совместимы с применяемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно вставить в раздельные векторы или оба гена вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Гены антител вставляют в вектор(-ы) экспрессии с помощью стандартных способов (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и на векторе или лигированием по «тупым» концам, если отсутствуют сайты рестрикции). Вариабельные участки легкой и тяжелой цепей описываемых в настоящем документе антител можно применять для создания генов полноразмерных антител любого изотипа антитела путем вставки их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные участки тяжелой цепи и константные участки легкой цепи требуемого изотипа, так чтобы сегмент V_H был функционально связан с сегментом(сегментами) C_H в векторе, а сегмент V_L был функционально связан с сегментом C_L в векторе. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антител можно клонировать в вектор так, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т. е. сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

Помимо генов цепей антитела рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые регулируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы для регуляции экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые регулируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в работе Goeddel (Gene Expression Technology. *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что конструкция вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, требуемый уровень экспрессии белка, среди прочих факторов. К предпочтительным регуляторным последовательностям для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих относятся вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса (например, главного позднего

промотора аденовируса (AdMLP)) и полиомавируса. Альтернативно, можно применять невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или β-глобиновый промотор. Кроме того, регуляторные элементы состоят из последовательностей из разных источников, например, промоторная система SRα, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все за авторством Axel и соавт.). Например, как правило, селективный маркерный ген придает клетке-хозяину, в которую был введен вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. К иллюстративным селективным маркерным генам относятся ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr- клетках-хозяевах с отбором посредством метатрексата/амплификацией) и ген neo (для отбора посредством G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей вектор(-ы) экспрессии, кодирующий(-ие) тяжелую и легкую цепи, вводят посредством трансфекции в клетку-хозяина стандартными методиками. Различные формы термина «трансфекция» охватывают широкий спектр методик, обычно применяемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию с DEAE-декстраном и другие. Хотя теоретически возможно экспрессировать описываемые в настоящем документе антитела в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках, и наиболее предпочтительно — клетках-хозяевах млекопитающих, является наиболее предпочтительной, поскольку такие эукариотические клетки, и в частности клетки млекопитающих, будут с большей вероятностью, чем в случае прокариотических клеток, собирать и секретировать правильно сложенное и иммунологически активное антитело. Сообщалось, что прокариотическая экспрессия генов антител не эффективна для получения высоких выходов активных антител (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Антитела по настоящему изобретению также можно получать в измененных методами гликоинженерии штаммах дрожжей. (*Pichia pastoris*. Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210).

К иллюстративным клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описываемых в настоящем документе, относятся клетки CHO (в том числе dhfr- клетки CHO, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216- 4220, применяемые с селектируемым маркером дигидрофолатредуктазы (DHFR), например, как описано в работе R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol. 159*:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, в случае применения с клетками миеломы NSO другой иллюстративной системой экспрессии является система экспрессии гена GS, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможной экспрессию антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрецию антитела в культуральную среду, в которой растут клетки-хозяева. Антитела можно выделить из культуральной среды с помощью стандартных способов очистки белка.

N- и C-концы полипептидных цепей антител по настоящему изобретению могут отличаться от ожидаемой последовательности вследствие обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, в тяжелых цепях антител зачастую отсутствуют C-концевые остатки лизина. (Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132). N-концевые остатки глутамина и, в меньшей степени, остатки глутамата зачастую превращаются в остатки пироглутамата как в легких, так и в тяжелых цепях терапевтических антител. (Dick *et al.* (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu *et al.* (2011) *JBC* 28611211; Liu *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211).

Аминокислотные последовательности для различных антител к hNKG2A по настоящему изобретению представлены в Перечне последовательностей. По рассмотренным выше причинам C-концевой лизин не включен во многие последовательности в Перечне последовательностей для тяжелых цепей или константных доменов тяжелых цепей. Тем не менее, в соответствии с альтернативным вариантом осуществления, каждая тяжелая цепь антител к hNKG2A по настоящему изобретению и/или генетическая конструкция, кодирующая такие антитела или их тяжелые или легкие цепи, включает такой дополнительный остаток лизина на C-конце тяжелой(-ых) цепи(-ей).

VII. Анализы

Описываемые в настоящем документе антитела можно протестировать в отношении связывания с NKG2A, например, с помощью стандартного ELISA. Например, на поверхность микротитрационных планшетов наносят покрытие очищенного NKG2A в

количестве 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведения антител (например, разведения плазмы от мышей, иммунизированных посредством NKG2A) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Планшеты промывают посредством PBS/Tween, а затем инкубируют со вторичным реагентом (например, в случае антител человека или антител, имеющих константный участок человеческой тяжелой цепи с реагентом на основе поликлонального антитела козы, специфичного к Fc IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 часа при 37°C. После промывки планшеты проявляют с субстратом ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем подвергают дополнительному скринингу с помощью проточной цитометрии в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей NKG2A человека, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует NKG2A. Вкратце: связывание антител к NKG2A оценивают путем инкубации NKG2A-экспрессирующих клеток CHO с антителом к NKG2A в разведении 1:20. Клетки промывают и связывание детектируют с помощью PE-меченого Ab к IgG человека. Анализы проточной цитометрией проводят с использованием устройства для проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Предпочтительно, для гибридизации будут использовать мышей, у которых проявляются наиболее высокие титры. Аналогичные эксперименты могут быть выполнены путем детекции мышиных антител, если необходимо детектировать мышиные антитела к HNKG2A.

ELISA, например, который описан выше, можно применять для скрининга в отношении антител и, таким образом, гибридом, которые продуцируют антитела, которые характеризуются положительной реактивностью с иммуногеном NKG2A. Гибридомы, которые продуцируют антитела, связывающиеся, предпочтительно с высокой аффинностью, с NKG2A, затем можно субклонировать и подвергнуть дополнительному анализу. Затем для создания клеточного банка и для очистки антител можно отобрать один клон из каждой гибридомы, который сохраняет реактивность исходных клеток (по результатам ELISA).

Для очистки антител к NKG2A выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Перед аффинной хроматографией на сефарозе с белком A (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси) супернатанты можно профильтровать и сконцентрировать. Для того, чтобы убедиться в степени чистоты, элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор можно заменить на

PBS, а концентрацию можно определить по OD_{280} с помощью коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разбить на аликвоты и хранить при -80°C.

Для определения, связываются ли выбранные моноклональные антитела к NKG2A с характерными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфилд, Иллинойс). Связывание биотинилированного MAb можно детектировать с помощью меченого стрептавидином зонда. Можно провести конкурентные исследования с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител с применением покрытых посредством NKG2A планшетов для ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител можно провести изотипические ELISA-анализы с применением реагентов, специфических к антителам конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела на поверхность лунки микротитрационных планшетов можно нанести покрытие 1 мкг/мл антитела к иммуноглобулину человека в течение ночи при 4°C. После блокирования посредством 1% BSA планшеты подвергают реакции с 1 мкг/мл или менее тестируемых моноклональных антител или очищенных изотипических контролей при температуре окружающей среды в течение одного-двух часов. Затем лунки можно подвергнуть реакции с конъюгированными с щелочной фосфатазой зондами, специфическими либо к человеческому IgG1, либо к человеческому IgM. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для тестирования связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими NKG2A, можно применять проточную цитометрию. Вкратце: линии клеток, экспрессирующие мембраносвязанный NKG2A (выращенные в стандартных ростовых условиях), смешивают с концентрациями A моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение одного часа. После промывки клетки подвергают реакции с меченым фикоэритрино (PE) антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичным антителом. Образцы можно проанализировать с помощью прибора FACScan с использованием свойств светового и бокового рассеяния для гейтирования на отдельные клетки и определяют связывание меченых антител. Можно использовать альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии (помимо или вместо) анализа проточной цитометрией. Клетки можно окрасить точно так же, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Данный способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может обладать уменьшенной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Антитела к hNKG2A можно дополнительно протестировать в отношении реактивности с антигеном NKG2A с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце: можно получить клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих NKG2A, и подвергнуть их электрофорезу на полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% мышиной сывороткой и зондируют посредством подлежащих тестированию моноклональных антител. Связывание IgG можно детектировать с помощью щелочной фосфатазы на антителе к IgG и проявить с применением таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

К способам анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к NKG2A относятся стандартные анализы, известные в настоящей области техники, например, интерферометрический анализ слоя биомолекул (BLI) и SPR-анализ Biacore с применением прибора для SPR от Biacore.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A специфически связывается с внеклеточным участком NKG2A человека. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело связывается с конкретным доменом (например, функциональным доменом) внутри внеклеточного домена NKG2A. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A специфически связывается с внеклеточным участком NKG2A человека и внеклеточным участком NKG2A яванского макака. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A связывается с NKG2A человека с высокой аффинностью.

VIII. Мультиспецифические молекулы

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела могут быть мультиспецифическими, например, биспецифическими или триспецифическими молекулами. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, такие как мультиспецифические антитела, содержат два или более антигенсвязывающих сайта, каждый из которых специфичен к различному эпитопу. Различные эпитопы могут быть частью одних и тех же или различных антигенов. В соответствии с одним вариантом осуществления один антигенсвязывающий сайт специфичен к NKG2A человека, а другой специфичен к другому антигену. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемое в настоящем документе антитело к hNKG2A или его антигенсвязывающие фрагменты соединены с другой антигенсвязывающей молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или фрагментом антитела либо лигандом для рецептора), имеющей иную специфичность связывания, с получением

биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или целевыми молекулами. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемое в настоящем документе антитело дериватизировано или соединено с более чем одной другой антигенсвязывающей молекулой с получением мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя разными сайтами связывания и/или целевыми молекулами. Следовательно, настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, имеющим по меньшей мере одну первую специфичность связывания к NKG2A и вторую специфичность связывания ко второму целевому эпитопу. В соответствии с описанным в настоящем документе вариантом осуществления, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно иметь третью специфичность связывания.

В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе биспецифические молекулы содержат, выполняющее роль специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент такого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')2, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может быть димером легкой цепи или тяжелой цепи или любым его минимальным фрагментом, таким как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в Ladner *et al.*, патенте США № 4946778, содержание которого в прямой форме включено посредством ссылки.

Хотя человеческие моноклональные антитела являются предпочтительными, другие антитела, которые можно использовать в описываемых в настоящем документе биспецифических молекулах, представляют собой мышиные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Описываемые в настоящем документе биспецифические молекулы можно получить путем конъюгирования составляющих молекул, обладающих специфичностью связывания, с помощью способов, известных в настоящей области техники. Например, каждую обладающую специфичностью связывания часть биспецифической молекулы можно получить отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Если в качестве обладающих специфичностью связывания частей выступают белки или пептиды, то для ковалентной конъюгации можно использовать целый ряд связывающих или сшивающих средств. Примеры сшивающих средств включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (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). К другим способам относятся способы, 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). Предпочтительными конъюгирующими средствами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

Если обладающими специфичностью связывания частями являются антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания С-концевых шарнирных участков двух тяжелых цепей. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления шарнирный участок модифицируют так, чтобы перед конъюгацией он содержал нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один.

Альтернативно, обе обладающие специфичностью связывания части можно закодировать в одном и том же векторе и экспрессировать и собрать в одной и той же клетке-хозяине. Такой способ особенно полезен, если биспецифическая молекула имеет комбинацию обладающих специфичностью связывания частей, такую как белок слияния (mAb × mAb), (mAb × Fab), (Fab × F(ab')2) или (лиганд × Fab). Описываемая в настоящем документе биспецифическая молекула может быть одноцепочечной молекулой, содержащей одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203, патенте США № 5455030, патенте США № 4881175, патенте США № 5132405, патенте США № 5091513, патенте США № 5476786, патенте США № 5013653, патенте США № 5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими целевыми молекулами можно подтвердить с помощью признанных в настоящей области техники способов, например, с помощью ELISA, радиоиммуноанализа (RIA), FACS-анализа, биоанализа (например, ингибирования роста) или вестерн-блоттинга. Каждый из этих анализов обычно позволяет детектировать наличие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфического к представляющему интерес комплексу.

IX. Композиции

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, например, фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько описываемых в настоящем документе антител к NKG2A или их антигенсвязывающих фрагментов, составленных совместно с фармацевтически приемлемым носителем. Соответственно,

композиции по настоящему изобретению включают человеческие или гуманизированные антитела к hNKG2A (или их антигенсвязывающие фрагменты), имеющие последовательности CDR, последовательности вариабельного участка тяжелой и/или легкой цепи или полноразмерные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, изложенные в настоящем документе. Композиции по настоящему изобретению также включают антитела к hNKG2A, имеющие последовательности, которые являются вариантами последовательностей, изложенных в Перечне последовательностей. Например, такие антитела могут содержать последовательности, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательностям CDR, последовательностям вариабельного участка тяжелой и/или легкой цепи или полноразмерным последовательностям тяжелой и/или легкой цепи, изложенным в Перечне последовательностей.

Такие композиции также могут включать одно или комбинацию (например, из двух или более различных) описываемых в настоящем документе антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул. Например, описываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифических антител), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене или которые обладают дополняющими активностями.

Описываемые в настоящем документе фармацевтические композиции также можно вводить в форме комбинированной терапии, т. е. антител к NKG2A в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать в себя описываемое в настоящем документе антитело к NKG2A в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым и/или стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки средством. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о применениях описываемых в настоящем документе антител.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые в настоящем документе фармацевтические композиции могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или средства, применяемые для лечения рака. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данную форму рака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция содержит первое антитело, специфичное к hNKG2A, и второе антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое антитело и второе

антитело присутствуют в композиции в фиксированной дозе (т. е. в фиксированном соотношении). В соответствии с другими вариантами осуществления такая фиксированная доза составляет по меньшей мере от приблизительно 1:200 по меньшей мере до приблизительно 200:1, по меньшей мере от приблизительно 1:150 по меньшей мере до приблизительно 150:1, по меньшей мере от приблизительно 1:100 по меньшей мере до приблизительно 100:1, по меньшей мере от приблизительно 1:75 по меньшей мере до приблизительно 75:1, по меньшей мере от приблизительно 1:50 по меньшей мере до приблизительно 50:1, по меньшей мере от приблизительно 1:25 по меньшей мере до приблизительно 25:1, по меньшей мере от приблизительно 1:10 по меньшей мере до приблизительно 10:1, по меньшей мере от приблизительно 1:5 по меньшей мере до приблизительно 5:1, по меньшей мере от приблизительно 1:4 по меньшей мере до приблизительно 4:1, по меньшей мере от приблизительно 1:3 по меньшей мере до приблизительно 3:1 или по меньшей мере от приблизительно 1:2 по меньшей мере до приблизительно 2:1 мг антитела к hNKG2A к мг второго антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фиксированная доза 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 или приблизительно 1:200 антитела к hNKG2A ко второму антителу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фиксированная доза составляет по меньшей мере приблизительно 2:1, приблизительно 3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5:1, приблизительно 6:1, приблизительно 7:1, приблизительно 8:1, приблизительно 9:1, приблизительно 10:1, приблизительно 15:1, приблизительно 20:1, приблизительно 30:1, приблизительно 40:1, приблизительно 50:1, приблизительно 60:1, приблизительно 70:1, приблизительно 80:1, приблизительно 90:1, приблизительно 100:1, приблизительно 120:1, приблизительно 140:1, приблизительно 160:1, приблизительно 180:1 или приблизительно 200:1 мг первого антитела к мг второго антитела. Например, в соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A и второе антитело вводят так, как описано в примерах.

К дополнительным антителам относятся, например, одно или несколько из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к TIGIT, антитела к OX40 (также известного как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L), антитела к LAG-3, антитела к

CD73, антитела к CD137, антитела к CD27 или антитела к CSF-1R.

В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, придающие изотоничность средства и замедляющие абсорбцию средства и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель подходит для внутривенного введения. В соответствии с другими вариантами осуществления носитель подходит для подкожного введения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую антитело к NKG2A, доставляют подкожно с помощью технологии доставки лекарственных средств ENHANZE® от компании Halozyme, которая включает рекомбинантний человеческий фермент гиалуронидаза (rHuPH20), который на некоторое время разрушает гиалуронан. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления технология доставки лекарственных средств ENHANZE® делает возможным подкожное введение композиций, что является более быстрым по сравнению с внутривенным введением. В соответствии с другими вариантами осуществления в зависимости от пути введения активное соединение, т. е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, можно покрыть материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

К описываемым в настоящем документе фармацевтическим соединениям могут относиться одна или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» обозначает соль, которая сохраняет необходимую 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. К солям присоединения оснований относятся соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т. п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и т. п. К солям присоединения оснований относятся соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и

т. п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т. п.

Описываемая 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, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) металлохелаты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в описываемых в настоящем документе фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предупреждение присутствия микроорганизмов можно обеспечить как с помощью описанных выше процедур стерилизации, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. п. Также может быть необходимо включение в композиции придающих изотоничность средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. п. Кроме того, пролонгированную абсорбцию инъекционной фармацевтической формы можно придать путем включения средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

К фармацевтически приемлемым носителям относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного введения. Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем документе дополнительно включают средства для диспергирования внутритканевых лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые

гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX ™, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы их применения, в том числе rHuPH20, описаны в патентных публикациях США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному аспекту sHASEGP объединяют в комбинацию с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в настоящей области техники. В описываемых в настоящем документе фармацевтических композициях предусматривается применение любой традиционной среды или средства, кроме тех случаев, когда они несовместимы с активным соединением. В композиции также можно включить дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составить в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для лекарственного средства в высокой концентрации. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным будет включение в композицию придающих изотоничность средств, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель при необходимости с одним или комбинацией перечисленных ранее ингредиентов с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную среду для лекарства, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из описанных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка с вымораживанием (лиофилизация), с помощью которых на выходе получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из его подвергнутого ранее стерилизацией фильтрованием раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно объединять в комбинацию с материалом-носителем для получения однократной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подвергаемого лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно объединять в комбинацию с материалом-носителем для получения однократной лекарственной формы, обычно будет таким количеством композиции, которое производит терапевтический эффект. Из ста процентов данное количество может варьировать в диапазоне от приблизительно 0,01 процента до приблизительно девяноста девяти процентов активного ингредиента, например, от приблизительно 0,1 процента до приблизительно 70 процентов, например, от приблизительно 1 процента до приблизительно 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция включает антитело к NKG2A, такое как NKG2A.9. Композиция представляет собой стерильный, апирогенный, одноразовый, не содержащий консервантов, изотонический водный раствор для внутривенного введения. Композицию можно вводить неразбавленной или дополнительно разбавленной перед инфузией инъекционным раствором 0,9% хлорида натрия до требуемых концентраций белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A включает следующие вспомогательные вещества: L-гистин, моногидрат гидрохлорида L-гистидина, сахарозу, триамин пентауксусной кислоты (также известный как диэтилентриамин-пентауксусная кислота), полисорбат 80 и воду для инъекций.

Схемы дозирования корректируют таким образом, чтобы обеспечивался оптимальный требуемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно ввести однократную ударную дозу, несколько разделенных доз можно вводить на протяжении определенного периода времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичную дозированную форму для удобства введения и единообразия дозировки. В контексте настоящего документа единица дозирования обозначает физически дискретные единицы, подходящие в качестве однократных дозировок для подлежащих лечению пациентов; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация описываемых в настоящем документе единичных дозированных форм продиктована (а) уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом,

который необходимо достичь, и (b) ограничениями, присущими области техники получения смесей такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов, и непосредственно зависит от них.

В случае введения антитела дозировка может варьировать в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела субъекта, которому вводят такое антитело. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или лежать в пределах 1-10 мг/кг. В качестве альтернативы, введение антитела представляет собой фиксированную дозу, которая может находиться в диапазоне от 2 мг до 800 мг, например, дозу 25 мг, 80 мг, 200 мг или 400 мг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца, раз в четыре месяца, раз в пять месяцев или раз в шесть месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления схема лечения предусматривает начальную дозу, а затем поддерживающую дозу с другой величиной дозы с прерывистым интервалом приема.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одновременно вводят два или более моноклональных антител с различной специфичностью связывания, в таком случае дозировка каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтическое антитело вводят по несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут быть, например, следующими: еженедельно, один раз в три недели, один раз в четыре недели, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы также могут быть нерегулярными по результатам измерения уровня антител к целевому антигену у пациента. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозировку корректируют для достижения концентрации в плазме антитела приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в соответствии с некоторыми способами — приблизительно 25-300 мкг/мл.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением. Для введения с помощью составов с замедленным высвобождением может потребоваться менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях вводят относительно низкую дозировку с относительно длинными интервалами между введениями в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей их оставшейся жизни. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления для терапевтического лечения вводят относительно высокую дозировку с относительно короткими интервалами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вводят относительно высокую дозировку до тех пор, пока не будет уменьшено или устранено прогрессирование заболевания, например, до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное облегчение симптомов заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после терапевтического лечения пациенту назначают профилактическое лечение.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описываемых в настоящем документе фармацевтических композициях можно варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа в случае конкретного пациента, композиции и способа введения, не оказывая токсичного действия на пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций, которые описаны в настоящем документе, или сложного эфира, соли или амида в ней, способа введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и истории предшествующих заболеваний у проходящего лечение пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

«Терапевтически эффективная дозировка» описываемого в настоящем документе антитела к NKG2A предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предупреждению нарушения функционирования или инвалидизации вследствие заболевания. В контексте рака терапевтически эффективная доза предпочтительно предупреждает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных с раком. Симптомы рака хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, необычные родимые пятна, изменение внешнего вида родимого пятна, включая асимметрию, границу, цвет и/или диаметр, область недавно пигментированной кожи, аномальное родимое пятно, затемненную область под ногтями, уплотнения в молочной железе, изменения сосков, кисты в молочной железе, боль в молочной железе, смерть, потерю массы, слабость, чрезмерную усталость, затрудненное питание, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшение одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь в стуле, тошноту, рвоту, метастазы в печени, метастазы в легких, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие живота, жидкость в брюшной

полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие брюшной полости, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекцию, лихорадку, боль), боль, рвоту с кровью, сильную потливость, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстой кишке, метастазы в легких, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в костях, метастазы в почках и метастазы в поджелудочной железе, затруднение глотания и т. п. Терапевтическая эффективность может наблюдаться сразу после первого введения моноклонального антитела к hNKG2A по настоящему изобретению или может наблюдаться только после некоторого периода времени и/или серии доз. Такая отсроченная эффективность может наблюдаться лишь после нескольких месяцев лечения, например, до 6, 9 или 12 месяцев.

Терапевтически эффективная доза может предупреждать или замедлять начало развития рака, например, как это может быть необходимо при наличии ранних или предварительных признаков заболевания. Следовательно, для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака можно применять любой клинический или биохимический анализ, с помощью которого отслеживают любое из вышеизложенного. Специалист в настоящей области техники сможет определить такие количества, исходя из таких факторов, как размер субъекта, степень тяжести симптомов у субъекта и конкретная выбранная композиция или конкретный выбранный путь введения.

Описываемую в настоящем документе композицию можно вводить одним или несколькими путями введения с помощью одного или нескольких из ряда способов, которые известны в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будут варьировать в зависимости от требуемых результатов. К иллюстративным путям введения для описываемых в настоящем документе антител относятся внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, посредством инъекции или инфузии.

Альтернативно, описываемое в настоящем документе антитело можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или чрезслизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые,

биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы приготовления таких составов запатентованы или в общеизвестны специалистам в настоящей области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в настоящей области техники. Например, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления описываемую в настоящем документе терапевтическую композицию можно вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры известных имплантатов и модулей для применения с описываемыми в настоящем документе антителами к hNKG2A, включают: патент США № 4487603, в котором раскрыта имплантируемая микроинфузионная помпа для дозирования лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения медицинских препаратов через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыта помпа для инфузий лекарственного препарата, предназначенная для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыто имплантируемое устройство для инфузий с регулируемым потоком, предназначенное для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Специалистам в настоящей области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A можно составить так, чтобы обеспечивалось надлежащее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы описываемые в настоящем документе терапевтические соединения проходили через BBB (при необходимости), их можно составить, например, в липосомах. Способы получения липосом см., например, в патентах США №№ 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько молекул, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы, тем самым повышая целевую доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). К иллюстративным нацеливающим

молекулам относятся фолат или биотин (см., например, патент 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*) Immunocnocoбs* 4:273.

Также в объем, описываемый в настоящем документе, входят наборы, содержащие описываемые в настоящем документе композиции с антителами (например, человеческими антителами, биспецифическими или мультиспецифическими молекулами или иммуноконъюгатами) и инструкции по их применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных человеческих антител, описываемых в настоящем документе. Наборы могут включать этикетку, на которой указано назначение содержимого набора. Термин «этикетка» включает любой письменный или записанный материал, поставляемый на наборе или вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

X. Способы применения

Антитела, композиции с антителами и способы, описываемые в настоящем документе, имеют множество применений *in vitro* и *in vivo*, в том числе, например, усиление иммунного ответа путем блокирования взаимодействия NKG2A/HLA-E. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A являются моноклональными человеческими или гуманизированными антителами. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A (например, 13F3.A4, NKG2A.9 и NKG2A.11) можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям для усиления иммунитета при различных заболеваниях. В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитела к hNKG2A являются антагонистическими антителами. Настоящее изобретение относится к способам модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемых в настоящем документе антитела к NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента с тем, чтобы усилить, простимулировать или активировать иммунный ответ у субъекта. В соответствии с одним вариантом осуществления введение антитела к hNKG2A в соответствии с описываемыми в настоящем документе способами усиливает ответы с участием Т-клеток и/или NK-клеток. В соответствии с одним вариантом осуществления введение антитела к hNKG2A в соответствии с описываемыми в настоящем документе способами стимулирует, усиливает

или активирует антиген-специфические Т-клеточные ответы на опухоль. Т-клетки могут быть Teff-клетками, например, CD4+ Teff-клетками, CD8+ Teff-клетками, Т-хелперными (T_h) клетками и Т-цитотоксическими (T_c) клетками. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или гемобластоз, например, гематологическое злокачественное новообразование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления опухоль является неиммуногенной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления опухоль является положительной по PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления опухоль является отрицательной по PD-L1. Субъект также может быть носителем вируса, и у него усиливается иммунный ответ против вируса. В соответствии с одним вариантом осуществления введение антитела к hNKG2A в соответствии с описываемыми в настоящем документе способами стимулирует, усиливает или активирует NK-клеточные ответы.

В соответствии с одним вариантом осуществления способы приводят к усилению иммунного ответа у субъекта-человека, причем такое усиление оказывать требуемый эффект. В соответствии с одним вариантом осуществления субъект-человек представляет собой пациента-человека, имеющего нарушение, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа, например, Т-клеточного иммунного ответа. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пациент-человек болен раком. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном, или антиген уже может присутствовать у подлежащего лечению субъекта, например, у субъекта-носителя опухоли или вируса. При введении антител к NKG2A вместе с другим средством их можно вводить раздельно или одновременно.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста опухолевой клетки у субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A с тем, чтобы ингибировать рост опухолевой клетки у субъекта, такого как субъект-человек. Также настоящее изобретение относится к способам лечения хронической вирусной инфекции у субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе антитела к NKG2A с тем, чтобы подвергнут лечению хроническую вирусную инфекцию у субъекта, такого как субъект-человек.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A вводят субъекту, например, пациенту-человеку, в качестве дополнительной терапии, адъювантной терапии или неоадъювантной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления лечение болеющих раком субъектов посредством антитела к NKG2A может привести к долгосрочному устойчивому ответу по сравнению с текущим стандартом лечения; продлению дожития по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет, к периоду жизни без рецидивов по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение болеющего раком субъекта посредством описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A предотвращает рецидив рака или задерживает рецидив рака, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более лет. Лечение антителом к NKG2A можно применять в качестве терапии первой, второй или последующей линии.

Ниже более подробно рассмотрены эти и другие описываемые в настоящем документе способы.

Рак

Настоящее изобретение относится к способам лечения болеющего раком субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A таким образом, чтобы производить лечение субъекта, например, таким образом, чтобы ингибировать или уменьшить рост раковых опухолей и/или чтобы достичь регрессии опухолей. Антитело к NKG2A можно применять отдельно для ингибирования роста раковых опухолей. В качестве альтернативы, антитело к NKG2A можно применять в сочетании с другим средством, например, другими иммуногенными средствами, стандартными противораковыми средствами лечения или другими антителами, которые описаны далее. Также предусмотрена комбинация с ингибитором PD-1, таким как антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. Также предусмотрена комбинация с ингибитором CTLA-4, таким как антитело к CTLA-4. Также предусмотрена комбинация с ингибитором PD-1 и ингибитором CTLA-4. Также предусмотрена комбинация с агонистическим антителом к ICOS.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам лечения рака у субъекта, предусматривающим введение субъекту терапевтически эффективного количества описываемого в настоящем документе антитела к NKG2A. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к NKG2A может быть химерным антителом, человеческим антителом или гуманизированным антителом к NKG2A. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе способы лечения рака предусматривают введение антитела к NKG2A, которое входит в контакт с NKG2A человека по одному или нескольким аминокислотным остаткам:

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158); и

(d) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159).

В соответствии с другим вариантом осуществления описываемые в настоящем документе способы лечения рака предусматривают введение антитела к NKG2A, которое входит в контакт с NKG2A человека по одному или нескольким аминокислотным остаткам:

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158);

(d) L; и

(e) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159).

В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение антитела NKG2A.9 для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение композиции, содержащей антитело 13F3.A4 для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение антитела NKG2A.11 для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления, способ предусматривает введение композиции, содержащей антитело NKG2A.9 для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение композиции, содержащей антитело NKG2A.11 для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение антитела 13F3.A4 или его варианта для лечения рака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает введение композиции, содержащей антитело 13F3.A4 или его вариант, для лечения рака.

Примеры рака включают без ограничения плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), плоскоклеточный NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, почечный рак (например, светлоклеточный рак), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (например, почечно-клеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонорезистентную 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, рак желудка, герминому, детскую саркому, синоназальную опухоль натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной

области, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли в детском возрасте, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, включая аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные внешними факторами формы рака, в том числе формы рака, индуцированные асбестом, связанные с вирусами формы рака (например, связанную с вирусом папилломы человека (HPV) опухоль) и гематологические злокачественные новообразования, происходящие от любой из двух веток развития гемоцитов, т. е. линии миелоидных клеток (которая производит гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (которая производит B-, T-, NK-клетки и плазмоциты), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острую, хроническую, лимфоцитарную и/или миелогенную формы лейкоза, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2, с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированную гранулоцитарную саркому и хлорому; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), B-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитоидная B-клеточная лимфома, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная B-клеточная лимфома средостения, Т-лимфобластная лимфома клеток-предшественников, Т-лимфобластная лимфома; и лимфомы/лейкозы (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную эффузионную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидной ветки дифференцировки, острый лимфобластный лейкоз, диффузную

крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому клеток-предшественников, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую фунгоидными микозами или синдромом Сезари) и лимфоплазмацитоидную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, легкоцепочечная меланома, несекреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая медленно развивающейся миеломой), одиночная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; гематопоэтические опухоли миелоидной ветки дифференцировки, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; сперматоцитому, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосакарму и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, сперматоцитому, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопоэтические опухоли лимфоидной ветки дифференцировки, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая без ограничения Т-клеточные расстройства, такие как Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и медуллярный тип клеток; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL), предпочтительно Т-клеточного типа; a/d Т-клеточную неходжкинскую лимфому печени и селезенки; периферическую/посттимусную Т-клеточную лимфому (плеоморфного и иммунобластного подтипов); (назальную) Т-клеточную лимфангиому; рак головы или шеи, почечный рак, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных форм рака. В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе способы также можно применять для лечения метастатических форм рака, резистентных форм рака (например, форм рака, резистентных к предыдущей иммунотерапии, например, посредством блокирующего антитела к CTLA-4 и/или PD-1) и рецидивирующих форм рака.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят в виде монотерапии. В соответствии с одним вариантом осуществления агонистическое антитело к hNKG2A вводят в качестве единственного иммуностимулирующего средства. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят пациенту с другим средством. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят с иммуногенным средством. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят в сочетании с противораковой вакциной. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления противораковая вакцина содержит раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления противораковая вакцина представляет собой пептидную противораковую вакцину, которая в соответствии с некоторыми вариантами осуществления является персонализированной пептидной вакциной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидная противораковая вакцина представляет собой поливалентный длинный пептид, мультипептид, пептидный коктейль, гибридный пептид или импульсную пептидную вакцину дендритных клеток (см., например, Yamada *et al.*, Cancer Sci, 104:14-21, 2013). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в сочетании с адъювантом. Неограничивающие примеры применяемых противоопухолевых вакцин 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. Было разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. работы 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 работу Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В соответствии с одной из этих стратегий вакцину готовят с применением аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что такие клеточные вакцины наиболее эффективны при тансдукции опухолевых клеток для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является мощным активатором презентирования антигена при противоопухолевой вакцинации. Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43.

Другие противораковые вакцины включают белки от вирусов, связанных с развитием различных форм рака у человека, таких как папилломавирус человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы герпеса Капоши (KHSV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления другая форма опухолеспецифического антигена, которую применяют с ингибированием NKG2A, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные непосредственно из опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и такие HSP обладают высокой эффективностью при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для индукции

противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дендритные клетки являются высокоэффективными антигенпрезентирующими клетками, которые применяют для инициирования антигенспецифических ответов. Дендритные клетки можно получить *ex vivo* и загрузить различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Дендритные клетки также можно трансдуцировать генетическими средствами для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также были слиты непосредственно с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизацию дендритными клетками можно эффективно объединять в комбинацию с антителами к NKG2A для активации (запуска) более эффективных противоопухолевых ответов.

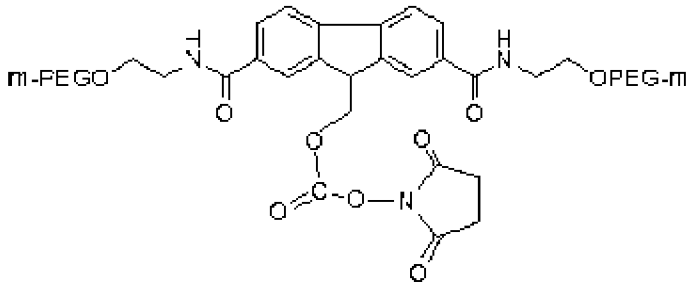
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят со стандартным лечением, например, хирургическом вмешательством, лучевой терапией и/или химиотерапией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с химиотерапевтическим средством. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с одним или несколькими из следующих компонентов: карбоплатином, цисплатином, паклитакселом, наб-паклитакселом, гемцитабином или FOLFOX. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с карбоплатином или наб-паклитакселом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в сочетании с карбоплатином и паклитакселем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с цисплатином и пеметрекседом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с цисплатином и гемцитабином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с FOLFOX. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с FOLFIRI. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят с дакарбазином для лечения меланомы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цисплатин вводят внутривенно в виде 100 мг/мл дозы один раз в четыре недели. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят вместе с доксорубицином (адриамицином), цисплатином, блеомицина сульфатом, кармустином, хлорамбуцилом, дакарбазином и/или циклофосфамида гидроксимочевиной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления адриамицин вводят внутривенно в виде дозы от 60 мг/мл до 75 мг/мл один

раз каждые 21 сутки. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят пациенту-человеку, который устойчив к лечению по меньшей мере одним лекарственным средством, причем введение антитела к hNKG2A снижает, ослабляет или устраняет устойчивость по меньшей мере к одному лекарственному средству. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят с агонистическим антителом, таким как антитело к ICOS.

Описываемые выше комбинированные способы терапии можно применять в различных комбинациях друг с другом, и они охватывают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средств включены в один и тот же или отдельные составы) и раздельное введение, в таком случае введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Антитела по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления другим примером такой комбинации является антитело к hNKG2A, вводимое в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинация антитела к hNKG2A и IL-2 предназначена для лечения различных форм рака, в том числе для лечения почечно-клеточной карциномы и меланомы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рассматриваемые в настоящем документе антитела к hNKG2A объединяют в комбинацию с агонистом пути IL-2 для лечения различных форм рака. Комбинация включает различные агонисты пути IL-2, такие как агонисты, описанные в WO 2012/065086 (Nektar Therapeutics) и WO 2015/125159 (Nektar Therapeutics), содержание которых во всей их полноте включено посредством ссылки. В WO 2006/138572 (Nektar Therapeutics) представлены конъюгаты, содержащие разрушаемую связь, и полимерные реагенты, пригодные для получения таких конъюгатов, а также способы получения полимерных реагентов и конъюгатов, и данная публикация включена во всей своей полноте посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациенту для лечения рака вводят комбинацию описываемоего в настоящем документе антитела к hNKG2A, такого как антитела NKG2A.9, NKG2A.11 или 13F3.A4, и агониста пути IL-2, такого как NKTR-214. Ниже более подробно описано, что NKTR-214 получают путем конъюгирования в среднем около шести реагентов по типу полиэтиленгликоля (PEG) на основе FMOC (флуоренилметилоксикарбонилхлорида), имеющих следующую структуру ($mPEG_2$-C2-fomc-20K-N-гидроксисукцинимидатное производное, 20 кДа («mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS»):



с белком, имеющим следующую 132-аминокислотную последовательность:

PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE
E 60

ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
120

ITFSQSIISTLT 132 (SEQ ID NO: 161)

В WO 2012/065086 представлены конъюгаты фрагмента на основе IL-2 и одного или нескольких непептидных водорастворимых полимеров, в том числе полиэтиленгликоля или его производного. В частности, в примере 2 (абзацы 202-204) публикации WO 2012/065086 описано пегилирование rIL-2 с помощью mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS с получением изложенной выше структуры mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS. В примере 1 (абзацах 63-66) публикации WO 2015/125159 описан масштабированный подход к пегилированию IL-2 с mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS, что приводит к получению RSLAIL-2 (NKTR-214). NKTR-214 представляет собой цитокин, предназначенный для целенаправленного воздействия на CD122 (также известный как бета-субъединица рецептора интерлейкина-2, IL-2Rβ), белок, встречающийся на определенных иммуноцитах (например, CD8+ Т-клетках и NK-клетках), с целью размножения этих клеток и усиления их противоопухолевых эффектов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в комбинации с антиангиогенным средством.

Другими комбинированными способами терапии, которые могут приводить к синергизму с описываемыми в настоящем документе антителами к hNKG2A посредством гибели клеток, являются облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A вводят в сочетании с биспецифическими антителами. Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два различных антигена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к hNKG2A применяют в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацелены на экспрессирующие Fcα- или Fcγ-рецептор эффекторные клетки, для лечения от опухолевых клеток (см.,

например, патенты США № 5922845 и № 5837243). Например, для нацеливания макрофагов на места локализации опухоли были использованы биспецифические антитела к Fc-рецептору/опухолевому антигену (например, Her-2/neu). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при помощи функциональной активности антитела к hNKG2A усиливают Т-клеточную группу данных ответов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген может быть доставлен непосредственно к DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером на клеточной поверхности, который специфичен для дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к hNKG2A применяют в комбинации с антителами, которые уменьшают или инактивируют иммуносупрессивные белки, экспрессируемые опухолью, например, антителами к TGF-β, антителами к IL-10 и антителами к лиганду Fas.

Инфекционные заболевания

Согласно другому аспекту, описываемое в настоящем документе изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, в том числе у субъекта-человека, предусматривающему введение субъекту антитела к hNKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента с тем, чтобы подвергнуть лечению субъекта от инфекционного заболевания. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело к NKG2A представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Аналогично лечению при помощи него от опухолей, как рассмотрено в настоящем документе, описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A можно вводить отдельно или в качестве адъюванта в комбинации с вакцинами для усиления иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены, в том числе для лечения хронических вирусных инфекций. Примеры патогенов, для которых данный терапевтический подход может быть особенно полезен, включают патогенов, против которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогенов, против которых обычные вакцины не полностью эффективны. К данным патогенам относятся без ограничения ВИЧ, вирус гепатита (A, B и C), вирус гриппа, вирус герпеса, *Giardia*, возбудитель малярии, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.*

Примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают ВИЧ, вирус гепатита (A, B или C), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, коксаки-вирус, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита,

ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC вирус и вирус арбовирусного энцефалита.

Примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают хламидию, риккетсиозную бактерию, микобактерию, стафилококк, стрептококк, пневмококк, менингококк и гонококк, клебсиеллу, протею, серратию, псевдомоны, легионеллу, дифтерию, сальмонеллу, бациллу, холеру, тетанус, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерию, вызывающую болезнь Лайма.

Примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают представителя рода Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, представителя рода *Aspergillus* (fumigatus, niger и т. д.), представителя рода *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают: *Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba* sp., *Giardia lambia, Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, Nippostrongylus brasiliensis.*

Описываемые в настоящем документе способы введения антител к hNKG2A субъекту можно объединять в комбинацию с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами, которая обеспечивает улучшенное презентирование опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Аутоиммунные реакции

[0001] Согласно некоторым аспектам антитела к NKG2A усиливают аутоиммунные ответы. Индукция противоопухолевых ответов с применением опухолевых клеток и пептидных вакцин свидетельствует о том, что многие противоопухолевые ответы включают различные формы аутоиммунной реактивности (van Elsas *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, *et al.* (1999*) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000), выше; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Поэтому антитела к NKG2A применяют с различными «своими» белками для разработки

протоколов вакцинации с целью эффективной индукции иммунных ответов против данных «своих» белков для лечения заболевания. Например, болезнь Альцгеймера предусматривает неприемлемое накопление пептида Aβ в амилоидных отложениях в головном мозге; ответы с участием антител против амилоида способны удалить эти амилоидные отложения (Schenk *et al.*, (1999) *Nature* 400: 173-177).

[0002] В качестве целевых можно также использовать и другие «свои» белки, такие как IgE в случае лечения аллергии и астмы и TNF-α в случае ревматоидного артрита. Наконец, путем применения антител к NKG2A можно индуцировать ответы с участием антител к различным гормонам. Для контрацепции можно использовать ответы с участием нейтрализующих антител к репродуктивным гормонам. Дополнительными целями вакцинации являются ответы с участием нейтрализующих антител к гормонам и другим растворимым факторам, которые необходимы для роста определенных опухолей.

[0003] Аналогичные описанным выше способы применения антител к NKG2A можно использовать для индукции терапевтических аутоиммунных ответов для лечения пациентов, имеющих неприемлемое накопление других аутоантигенов, например, отложения амилоидов, в том числе Aβ при болезни Альцгеймера, цитокинов, таких как TNF-α и IgE.

Вакцины

[0004] Согласно некоторым аспектам описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A применяют для стимуляции антиген-специфических иммунных ответов путем введения антитела к NKG2A вместе с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Соответственно, настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающим введение субъекту: (i) антигена; и (ii) антитела к NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента с тем, чтобы усилить у субъекта иммунный ответ на антиген. Антитело может быть человеческим антителом к NKG2A человека (таким как любое из описываемых в настоящем документе человеческих антител к NKG2A). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к NKG2A представляет собой химерное или гуманизированное антитело. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, рассмотренные в разделах настоящего документа, такие как рассмотренные в настоящем документе опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины) или антигены описываемых в настоящем документе вирусов, бактерий или других патогенов.

[0005] В соответствии с определенными вариантами осуществления пептидный или слитый белок, содержащий эпитоп, с которым связывается антитело к NKG2A, применяют в качестве вакцины вместо антитела к NKG2A или в дополнение к нему.

[0006] Подходящие пути введения описываемых в настоящем документе композиций с антителами (например, человеческими моноклональными антителами, мультиспецифическими и биспецифическими молекулами и иммуноконъюгатов) *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны специалистами в настоящей области техники. Например, композиции с антителами можно вводить внутривенным или подкожным путем. Подходящие дозировки применяемой композиции будут зависеть от возраста и массы субъекта, а также от концентрации и/или состава композиции с антителами.

[0007] Как описано ранее, описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммунодепрессантом. Антитело к NKG2A может быть соединено со средством (в виде иммунокомплекса), или его можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело к NKG2A можно вводить до, после или параллельно со средством или можно вводить совместно с другими известными средствами терапии, например, со средством противораковой терапии, например, химиотерапией/облучением. Такие терапевтические средства включают, среди прочего, противоопухолевые средства, такие как доксорубицин (адриамицин), цисплатин, блеомицина сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамидгидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только на уровнях, токсичных или субтоксичных для пациента. Цисплатин внутривенно вводят дозой 100 мг/мл раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно дозой 60-75 мг/мл раз в 21 сутки. Совместное введение описываемых в настоящем документе антител к NKG2A или их антигенсвязывающих фрагментов с химиотерапевтическими средствами обеспечивает присутствие двух противораковых средств, которые действуют посредством различных механизмов, что дает цитотоксический эффект на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы, связанные с развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что сделало бы их инертными для антитела.

[0008] Также в объем, описываемый в настоящем документе, входят наборы, содержащие описываемые в настоящем документе композиции с антителами (например, человеческими антителами, биспецифическими или мультиспецифическими молекулами

или иммуноконъюгатами) и инструкции по их применению. Набор может дополнительно содержать по меньше мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных описываемых в настоящем документе человеческих антител к NKG2A, (например, человеческое антитело, обладающее комплементарной активностью, которое связывается с эпитопом в антигене NKG2A, отличное от первого человеческого антитела). Наборы, как правило, включают этикетку, на которой указано назначение содержимого набора. Термин «этикетка» включает любой письменный или записанный материал, поставляемый на наборе или вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

Комбинированные терапии

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам комбинированной терапии, например, для лечения рака, при которых антитело к hNKG2A вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами, например, антителами, которые эффективны при стимуляции иммунных ответов, таким образом дополнительно усиливая, стимулируя или активируя иммунные ответы у субъекта, в том числе у субъекта-человека. Настоящее изобретение относится к способам лечения или отсрочки прогрессирования рака у индивидуума, предусматривающим введение индивидууму антитела к hNKG2A (например, NKG2A.9, NKG2A.11 и 13F3.A4) в сочетании с другим противораковым средством или средством противораковой терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A можно вводить в сочетании со средством химиотерапии либо химиотерапевтическим средством или со средством лучевой терапии либо радиотерапевтическим средством, как описано выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A можно вводить в сочетании с агонистическим антителом, таким как антитело к hICOS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A можно вводить в сочетании с целенаправленной терапией или целенаправленным терапевтическим средством. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A можно вводить в сочетании со средством иммунотерапии или иммунотерапевтическим средством, например, моноклональным антителом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемое в настоящем документе антитело к hNKG2A можно объединять в комбинацию с (i) агонистом другого костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на Т-клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная терапия, предусматривающая применение антитела к hNKG2A и агониста и/или антагониста, приводит к усиленному антиген-специфическому Т-клеточному ответу у

субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для усиления иммунного ответа описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A можно вводить в сочетании со средством, нацеленным на костимулирующую и коингибирующую молекулу, которая является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A можно вводить в сочетании со средством, которое нацелено на лиганд костимулирующей или коингибирующей молекулы. Семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, куда входят B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с родственными представителями семейства рецепторов TNF, к которым относятся CD40, CD40L, EDA2, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTβR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, TNFR1, лимфотоксин α/TNFβ, TNFR2, TNFα, LTβR, лимфотоксин α 1β2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

Согласно другому аспекту антитела к hNKG2A можно применять в комбинации с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF-ß, VEGF; или других «иммуносупрессирующих цитокинов», или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Согласно одному аспекту Т-клеточные ответы стимулируют при помощи комбинации описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A и одного или нескольких из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторов иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин 1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, DR3 и CD28H.

К иллюстративным средствам, которые модулируют один из вышеуказанных белков и могут быть объединены в комбинацию с антителами к hNKG2A, например, описанными в настоящем документе, для лечения рака, относятся: YERVOY®/ипилимумаб или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), пидилизумаб/CT-

011 (к PD-1), KEYTRUDA®/пембролизумаб/MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), CP-870893 или дацетузумаб/SGN-40 (CD40 – Kirkwood *et al.* (2012) *CA Cancer J. Clin.* 62:309; Vanderheide & Glennie (2013) *Clin. Cancer Res.* 19:1035), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3 – WO 11/109400), IMP321 (к LAG-3), урелумаб/BMS-663513 и PF-05082566 (к CD137/4-1BB), варлилумаб/CDX-1127 (к CD27), MEDI-6383 и MEDI-6469 (к OX40), RG-7888 (к OX40L – WO 06/029879), атацицепт (к TACI), муромонаб-CD3 (к CD3), ипилумумаб (к CTLA-4). Следовательно, в соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A (такое как NKG2A.9) объединяют в комбинацию с антителом к PD-1 (таким как ниволумаб) и/или антителом к CTLA-4 (таким как ипилимумаб).

К другим молекулам, которые можно объединять в комбинацию с антителами к hNKG2A для лечения рака, относятся антагонисты ингибиторных рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, антитела к hNKG2A можно объединять в комбинацию с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

К еще одним средствам для комбинированной терапии относятся средства, которые ингибируют макрофаги или моноциты или уменьшают их количество, включая без ограничения антагонисты CSF-1R, такие как антагонисты CSF-1R, включая RG7155 (WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или FPA-008 (WO 11/140249; WO 13/169264; WO 14/036357).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе антитела к hNKG2A применяют вместе с одним или несколькими агонистическими средствами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими средствами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, и одним или несколькими средствами, которые системно увеличивают встречаемость противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые компенсируют различные иммуносупрессорные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют задействование ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), уменьшают количество или ингибируют Treg-клетки (например, с помощью моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем *ex vivo* уменьшения количества с помощью микроносителей с антителами к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предупреждают анергию или истощение Т-клеток), и средствами, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в местах локализации опухоли.

Настоящее изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа у субъекта, предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A и одного или

нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист PD-1, например, антагонистическое антитело, антагонист PD-L1, например, антагонистическое антитело, антагонист CTLA-4, например, антагонистическое антитело, и/или антагонист LAG3, например, антагонистическое антитело, с тем, чтобы простимулировать иммунный ответ у субъекта, например, для ингибирования опухолевого роста или для стимуляции противовирусного ответа. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антитело к hNKG2A и антагонистическое антитело к PD-1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антитело к hNKG2A и антагонистическое антитело к PD-L1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антитело к hNKG2A и антагонистическое антитело к CTLA-4. В соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое антитело к PD-1, антагонистическое антитело к PD-L1, антагонистическое антитело к CTLA-4 и/или антагонистическое антитело к LAG3) является человеческим антителом. Альтернативно, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может быть, например, химерным или гуманизированным антителом (например, полученным из мышиного или хомячьего антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и/или антитела к LAG3).

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A и антагонистического антитела к PD-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или колоректальный рак (CRC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак характеризуется опухолями с (i) повышенными уровнями HLA-E; и/или (ii) более высоким мутационным бременем опухоли. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-1 вводят в субтерапевтической дозе или их оба вводят в субтерапевтической дозе. Настоящее изобретение также относится к способам изменения нежелательного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством. В соответствии с одним вариантом осуществления способ предусматривает введение субъекту антитела к hNKG2A и субтерапевтической дозы антитела к PD-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой человеческое моноклональное антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящим описываемых способах известные в настоящей области техники антитела к PD-1

применяют в комбинации с описываемыми в настоящем документе антителами к NKG2A. Различные человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью, раскрыты в патенте США № 8008449. Было продемонстрировано, что человеческие антитела к PD-1, раскрытые в патенте США № 8008449, обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (a) связываются с PD-1 человека с K_D 1×10^{-7} М или менее по результатам определения с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением биосенсорной системы Biacore; (b) практически не связываются с человеческими CD28, CTLA-4 или ICOS; (c) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе с реакцией смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (d) увеличивают продуцирование интерферона-γ в анализе с MLR; (e) увеличивают секрецию IL-2 в анализе с MLR; (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 антиген-специфические ответы с участием клеток памяти; (i) стимулируют ответы с участием антител; и (j) ингибируют рост опухолевых клеток *in vivo*. К антителам к PD-1, которые можно применять согласно настоящему изобретению, относятся моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и обладают по меньшей мере одной, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере пятью из представленных выше характеристик.

Другие моноклональные антитела к PD-1 были описаны, например, в патентах США №№ 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, публикации США № 2016/0272708 и PCT-публикациях №№ 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 во всей своей полноте включена посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (также известный как OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538), пембролизумаб (Merck; также известный как KEYTRUDA®, ламбролизумаб и MK-3475; см. WO2008/156712), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; также известное как AMP-514; см. WO 2012/145493), цемиплимаб (Regeneron; также известный 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), INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine;

также известное как SHR-1210; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol. 10*:136 (2017)), TSR-042 (Tesaro Biopharmaceutical; также известное как ANB011; см. WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; также известное 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) или IBI308 (Innovent; см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой полностью человеческое антитело изотипа IgG4 (S228P), представляющее собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1, которое избирательно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), тем самым блокируя подавление противоопухолевых функций Т-клеток (патент США № 8008449; Wang *et al.*, 2014 *Cancer Immunol Res. 2(9)*:846-56).

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело изотипа IgG4 (S228P), направленное против человеческого рецептора PD-1 (запрограммированной смерти 1 или запрограммированной клеточной смерти 1) на клеточной поверхности. Пембролизумаб описан, например, в патентах США №№ 8354509 и 8900587.

К антителам к PD-1, которые можно применять в раскрываемых способах, также относятся выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-1 с любым раскрываемым в настоящем документе антителом к PD-1, например, ниволумабом (см., например, патенты США № 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к PD-1 связывает тот же эпитоп, что и любое из описываемых в настоящем документе антител к PD-1, например, ниволумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти моноклональные антитела связываются с одним и тем же участком эпитопа на антигене и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с данным конкретным участком эпитопа. Согласно ожиданиям, данные перекрестно конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень схожие со свойствами эталонного антитела, например, ниволумаба, в силу их связывания с тем же участком эпитопа на PD-1. Перекрестно-конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основании их способности перекрестно конкурировать с

ниволумабом в стандартных анализах связывания PD-1, таких как анализ Biacore, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-1 или связываются с тем же участком эпитопа, что и антитело к человеческому PD-1, ниволумаб, являются моноклональными антителами. В случае введения субъектам-людям данные перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные либо человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела можно получить и выделить с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники.

К антителам к PD-1, которые можно применять в способах по настоящему изобретению, также относятся антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было в достаточной мере продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

Антитела к PD-1, подходящие для применения в раскрываемых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, к «антителу» к PD-1 относится антигенсвязывающая часть или фрагмент, которые связываются с рецептором PD-1 и характеризуются функциональными свойствами, схожими со свойствами цельных антител в том, что касается ингибирования связывания лиганда и активации иммунной системы. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ниволумабом за связывание с человеческим PD-1.

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A и антагонистического антитела к PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе или их оба вводят в субтерапевтической дозе. Настоящее изобретение относится к способам изменения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающим введение субъекту антитела к NKG2A и субтерапевтической дозы антитела к PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом

является человек. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, а антитело к hNKG2A представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки из раскрываемых в настоящем документе антител.

В способах по настоящему изобретению можно применять антитела к PD-L1, которые известны в настоящей области техники. Примеры антител к PD-L1, пригодные в способах по настоящему изобретению, включают антитела, раскрытые в патенте США № 9580507. Было продемонстрировано, что человеческие моноклональные антитела к PD-L1, раскрытые в патенте США № 9580507, обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (a) связываются с PD-L1 человека с K_D 1×10^{-7} M или менее по результатам определения с помощью SPR с применением биосенсорной системы Biacore; (b) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе с реакцией смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (c) увеличивают продуцирование интерферона-γ в анализе с MLR; (d) увеличивают секрецию IL-2 в анализе с MLR; (e) стимулируют ответы с участием антител; и (f) обращают действие Т-регуляторных клеток на эффекторные Т-клетки и/или дендритные клетки. К антителам к PD-L1, которые можно применять согласно настоящему изобретению, относятся моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-L1 и обладают по меньшей мере одной, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, по меньшей мере пятью из представленных выше характеристик.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (также известное как 12A4, MDX-1105; см., например, патент США № 7943743 и WO 2013/173223), атезолизумаб (Roche; также известный как TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; см. документ США № 8217149; см. также Herbst *et al.* (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000), дурвалумаб (AstraZeneca; также известный как IMFINZI™, MEDI-4736; см. WO 2011/066389), авелумаб (Pfizer; также известный 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) или CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik *et al.*, AACR:Abstract 4606 (Apr 2016)).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). Атезолизумаб представляет собой полностью гуманизированное моноклональное антитело к PD-L1 изотипа IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI™). Дурвалумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело к PD-L1 изотипа IgG1-каппа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®). Авелумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело к PD-L1 изотипа IgG1-лямбда.

В соответствии с другими вариантами осуществления моноклональное антитело к PD-L1 представляет собой 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1 или любую их комбинацию.

К антителам к PD-L1, которые можно применять в раскрываемых способах, также относятся выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-L1 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 с любым раскрываемым в настоящем документе антителом к PD-L1, например, атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к PD-L1 связывает тот же эпитоп, что и любое из описываемых в настоящем документе антител к PD-L1, например, атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что антитела связываются с одним и тем же участком эпитопа на антигене и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с данным конкретным участком эпитопа. Согласно ожиданиям, данные перекрестно конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень схожие со свойствами эталонного антитела, например, атезолизумаба и/или авелумаба, в силу их связывания с тем же участком эпитопа на PD-L1. Перекрестно-конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основании их способности перекрестно конкурировать с атезолизумабом и/или авелумабом в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ Biacore, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 или связываются с тем же участком эпитопа, что и антитело к человеческому PD-L1, такое как атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб, являются моноклональными антителами. В случае введения субъектам-людям данные перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные либо человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела можно получить и выделить с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники.

К антителам к PD-L1, которые можно применять в способах по настоящему изобретению, также относятся антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было в достаточной мере продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

Антитела к PD-L1, подходящие для применения в раскрываемых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-1 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, к «антителу» к PD-L1 относится антигенсвязывающая часть или фрагмент, которые связываются с PD-L1 и характеризуются функциональными свойствами, схожими со свойствами цельных антител в том, что касается ингибирования связывания рецептора и активации иммунной системы. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом за связывание с человеческим PD-L1.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A по настоящему изобретению комбинируют с антагонистом сигнального пути PD-1/PD-L1, таким как антагонист PD-1 (например, ниволумаб, также известный как MDX1106, который описан в WO 06/121168) или антагонист PD-L1, в комбинации с третьим иммунотерапевтическим средством (например, антителом к ICOS, таким как ICOS.33 IgG1f S267E (которое описано в патенте США № 10251945) в комбинации с ниволумабом и ипилимумабом). В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонистическое антитело к CTLA-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой YERVOY® (ипилимумаб или антитело 10D1, которое описано в PCT-публикации WO 01/14424) или тремелимумаб (который ранее назывался тицилимумабом, CP-675,206). В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонист GITR или антагонист OX-40, такой как раскрываемые в настоящем документе антитела к GITR или антитела к OX40. В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело к GITR. К числу подходящих антител к GITR относятся, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116) и MK-4166 (WO11/028683). В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонист IDO. К числу подходящих антагонистов IDO относятся, например, INCB-024360

(WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод или NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237).

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе антитела к hNKG2A и антагонистического антитела к CTLA-4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к hNKG2A вводят в субтерапевтической дозе, антитело к CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе или их оба вводят в субтерапевтической дозе. Настоящее изобретение относится к способам изменения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек.

В способах по настоящему изобретению можно применять антитела к CTLA-4, которые известны в настоящей области техники. Антитела к CTLA-4 по настоящему изобретению связываются с человеческим CTLA-4, нарушая взаимодействие CTLA-4 с человеческим рецептором B7. Поскольку взаимодействие CTLA-4 с B7 приводит к передаче сигнала, что приводит к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, усиливает или продлевает активацию таких Т-клеток, тем самым индуцируя, усиливая или продлевая иммунный ответ.

Человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 с высокой аффинностью, раскрыты в патенте США № 6984720. Другие моноклональные антитела к CTLA-4 были описаны, например, в патентах 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 во всей своей полноте включена в настоящий документ посредством ссылки. К антителам к CTLA-4, которые пригодны для настоящего изобретения, относятся моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и обладают по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя из представленных выше характеристик.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб (также известный как YERVOY®, MDX-010, 10D1; см. патент США № 6984720), MK-1308 (Merck), AGEN-1884 (Agenus Inc.; см. WO 2016/196237) или тремелимумаб (AstraZeneca; также известный как тицилимумаб, CP-675,206; см. WO 2000/037504 и Ribas, *Update Cancer Ther. 2(3)*: 133-39 (2007)). В соответствии с отдельными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

В соответствии с отдельными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб для применения в раскрываемых в настоящем документе способах. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, которое блокирует связывание CTLA-4 с его лигандами B7, тем самым стимулируя активацию Т-клеток и улучшая общую выживаемость (OS) у пациентов с поздними стадиями меланомы.

В соответствии с отдельными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой тремелимумаб.

В соответствии с отдельными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой MK-1308.

В соответствии с отдельными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой AGEN-1884.

К антителам к CTLA-4, которые можно применять в раскрываемых способах, также относятся выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 с любым раскрываемым в настоящем документе антителом к CTLA-4, например, ипилимумабом и/или тремелимумабом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к CTLA-4 связывает тот же эпитоп, что и любое из описываемых в настоящем документе антител к CTLA-4, например, ипилимумаб и/или тремелимумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что антитела связываются с одним и тем же участком эпитопа на антигене и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с данным конкретным участком эпитопа. Согласно ожиданиям, данные перекрестно конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень схожие со свойствами эталонного антитела, например, ипилимумаба и/или тремелимумаба, в силу их связывания с тем же участком эпитопа на CTLA-4. Перекрестно-конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основании их способности перекрестно конкурировать с ипилимумабом и/или тремелимумабом в стандартных анализах связывания CTLA-4, таких как анализ Biacore, ELISA-анализы или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 или связываются с тем же участком эпитопа, что и антитело к человеческому CTLA-4, такое как ипилимумаб и/или тремелимумаб, являются моноклональными антителами. В случае введения субъектам-людям данные перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные либо человеческие

антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела можно получить и выделить с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники.

К антителам к CTLA-4, которые можно применять в способах по настоящему изобретению, также относятся антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было в достаточной мере продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела.

Антитела к CTLA-4, подходящие для применения в раскрываемых 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 человеческим рецептором B7. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, к «антителу» к CTLA-4 относится антигенсвязывающая часть или фрагмент, которые связываются с CTLA-4 и характеризуются функциональными свойствами, схожими со свойствами цельных антител в том, что касается ингибирования взаимодействия CTLA-4 с человеческим рецептором B7 и активации иммунной системы. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ипилимумабом и/или тремелимумабом за связывание с человеческим CTLA-4.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A по настоящему изобретению объединяют в комбинацию с антителом к CTLA-4 в комбинации с третьим иммунотерапевтическим средством. В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонист GITR или антагонист OX-40, такой как раскрываемые в настоящем документе антитела к GITR или антитела к OX40. В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело к GITR. К числу подходящих антител к GITR относятся, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116) и MK-4166 (WO11/028683). В соответствии с одним вариантом осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонист IDO. К числу подходящих антагонистов IDO относятся, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод или NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237).

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A

и антитела к LAG-3. В соответствии со следующими вариантами осуществления агонистическое антитело к hNKG2A вводят в субтерапевтической дозе, антитело к LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе или их оба вводят в субтерапевтической дозе. Настоящее изобретение относится к способам изменения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающим введение субъекту антитела к hNKG2A и субтерапевтической дозы антитела к LAG-3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к hNKG2A представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, а антитело к hNKG2A представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки из раскрываемых в настоящем документе антител. Примеры антител к LAG3 включают антитела, содержащие CDR или вариабельные участки из антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в публикации патентной заявки США № US2011/0150892 и WO2014/008218. В соответствии с одним вариантом осуществления антителом к LAG-3 является BMS-986016. К другим антителам к LAG-3, которые можно применять, относятся IMP731, описанное в US 2011/007023, или IMP-321. Также в комбинированных способах лечения можно применять антитела к LAG-3, которые конкурируют за тот же эпитоп и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к LAG-3 связывается с человеческим LAG-3 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-8} М и 1×10^{-10} М или менее.

Введение антител к hNKG2A, которые описаны в настоящем документе, и других антагонистов, например, антагонистических антител, к одному или нескольким целевым антигенам, таким как LAG-3, и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, усиливает иммунный ответ на раковые клетки у пациента. К формам рака, рост которых можно ингибировать с помощью антител по настоящему раскрытию, относятся формы рака, обычно отвечающие на иммунотерапию. Примеры форм рака для лечения описываемой в настоящем документе комбинированной терапией включают без ограничения описанные выше при рассмотрении монотерапии антителами к hNKG2A.

В соответствии с определенными вариантами осуществления комбинацию рассматриваемых в настоящем документе терапевтических антител можно вводить одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде раздельных композиций с каждым антителом в фармацевтически

приемлемом носителе. В соответствии с другим вариантом осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и антитело к hNKG2A можно вводить последовательно, при этом, к примеру, антитело к CTLA-4 вводят первым, а антитело к hNKG2A вводят вторым, или антитело к hNKG2A вводят первым, а антитело к CTLA-4 вводят вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-1 и антитело к hNKG2A можно вводить последовательно, при этом, к примеру, антитело к PD-1 вводят первым, а антитело к hNKG2A вторым, или антитело к hNKG2A вводят первым, а антитело к PD-1 вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-L1 и антитело к hNKG2A можно вводить последовательно, при этом, к примеру, антитело к PD-L1 вводят первым, а антитело к hNKG2A вторым, или антитело к hNKG2A вводят первым, а антитело к PD-L1 вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к LAG-3 и антитело к hNKG2A можно вводить последовательно, при этом, к примеру, антитело к LAG-3 вводят первым, а антитело к hNKG2A вторым, или антитело к hNKG2A вводят первым, а антитело к LAG-3 вторым.

Кроме того, если последовательно вводить более одной дозы комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть обращен или сохранен в том же порядке в каждый момент времени введения, последовательные введения можно объединять в комбинацию с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и антитела к hNKG2A может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с первым антителом к CTLA-4 и вторым антителом к hNKG2A, а третье введение может быть последовательным с первым антителом к hNKG2A и вторым антителом к CTLA-4, и т. д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-1 и антитела к hNKG2A может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с первым антителом к PD-1 и вторым антителом к hNKG2A, а третье введение может быть последовательным с первым антителом к hNKG2A и вторым антителом к PD-1, и т. д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-L1 и антитела к hNKG2A может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с первым антителом к PD-L1 и вторым антителом к hNKG2A, а третье введение может быть последовательным с первым антителом к hNKG2A и вторым антителом к PD-L1, и т. д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к LAG-3 и антитела к hNKG2A может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с первым антителом к LAG-3 и вторым антителом к hNKG2A, а третье введение может быть последовательным с первым антителом к hNKG2A и вторым антителом к LAG-3, и т. д. Другая типичная схема введения доз может предусматривать первое введение, которое

является последовательным с первым антителом к hNKG2A и вторым антителом к CTLA-4 (и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3), а последующие введения могут быть одновременными.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A, в качестве единственного иммунотерапевтического средства, или комбинацию из антитела к hNKG2A и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, антител к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) можно дополнительно объединить с иммуногенным средством, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные 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 тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно рассмотрено ниже). Агонист ICOS и одно или несколько дополнительных антител (например, блокирующих CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) также можно дополнительно объединять в комбинацию со стандартными способами противоракового лечения. Например, агонист ICOS и одно или несколько дополнительных антител (например, блокирующих CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно объединять в комбинацию с химиотерапевтическими схемами лечения. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят пациенту вместе с антителом к CTLA-4, и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3 в комбинации с дакарбазином для лечения меланомы. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A вводят пациенту с антителом к CTLA-4, и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3 в комбинации с интерлейкином 2 (IL-2) для лечения рака, в том числе меланомы. Другие комбинированные терапии, которые могут приводить к синергизму при использовании комбинации антитела к hNKG2A с молекулами к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, которые оказывают антагонистическое действие посредством цитотоксичности, или без них, включают в себя облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. В соответствии с другим вариантом осуществления с антителом к hNKG2A и молекулами к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, которые оказывают антагонистическое действие, в комбинацию также можно объединять ингибиторы ангиогенеза.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A, в качестве единственного иммунотерапевтического средства, или комбинациию из антитела к hNKG2A и антител, блокирующих CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3, также можно применять в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают эффекторные клетки, которые экспрессируют Fcα- или Fcγ-рецептор, на опухолевые клетки. См., например, патенты США № 5922845 и № 5837243. Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к hNKG2A, в качестве единственного иммунотерапевтического средства, или комбинацию из антитела к hNKG2A и дополнительного иммуностимулирующего средства, например, антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3, можно применять в сочетании с противоопухолевым средством, таким как RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тозитумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб). В качестве примера и без привязки к теории, лечение посредством противоракового антитела или противораковым антителом, которое конъюгировано с токсином, может привести к гибели раковых клеток (например, опухолевых клеток), что может потенцировать иммунный ответ, опосредованный иммуностимулирующим средством, например, антителом к NKG2A, антителом к TIGIT, антителом к CTLA-4, антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом к ICOS и/или антителом к LAG-3. В соответствии с одним вариантом осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может предусматривать применение противоракового средства, например, антитела, в комбинации с антителом к NKG2A и необязательно дополнительным иммуностимулирующим средством, например, антителом к CTLA-4, и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3, одновременно, или последовательно, или в любой их комбинации, что может потенцировать противоопухолевые иммунные ответы у хозяина.

Настоящее изобретение относится к способам уменьшения, ослабления или устранения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака) иммуностимулирующим средством, предусматривающим введение субъекту антитела к NKG2A с антителом к CTLA-4, и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3 или без него/них. В соответствии с одним вариантом осуществления способ приводит к уменьшению частоты индуцированного иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения пациенту неабсорбируемого стероида. В контексте настоящего документа термин

«неабсорбируемый стероид» обозначает глюкокортикоид, который характеризуется обширным пресистемным метаболизмом так, чтобы после метаболизма в печени биодоступность стероида была низкой, т. е. менее приблизительно 20%. В соответствии с одним описанным в настоящем документе вариантом осуществления неабсорбируемым стероидом является будесонид. Будесонид представляет собой локально действующий глюкокортикостероид, который интенсивно метаболизируется, прежде всего печенью, после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой зависимый от pH и времени пероральный состав с будесонидом, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по всей длине толстой кишки. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона легкой - умеренной степени тяжести с вовлечением подвздошной кишки и/или восходящей ободочной кишки. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/сутки. ENTOCORT EC® высвобождается в различных отделах кишечника до того момента, как он абсорбируется и задержится в слизистой оболочке кишечника. После его прохождения через целевую слизистую ткань кишечника ENTOCORT EC® интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени с образованием метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида дает улучшенное терапевтическое соотношение, по сравнению с другими глюкокортикоидами, с менее интенсивным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит к меньшему количеству побочных эффектов, в том числе к уменьшению подавления функции гипоталамо-гипофизарной системы, чем в случае системно действующих кортикостероидов. Тем не менее, хроническое введение ENTOCORT EC® может приводить к системным эффектам, вызываемым глюкокортикоидами, таким как гиперкортицизм и подавление функции надпочечников. См. PDR 58th ed. 2004; 608-610.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к NKG2A с антагонистом CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или LAG-3 или без него в сочетании с неабсорбируемым стероидом можно дополнительно объединять в комбинацию с салицилатом. К салицилатам относятся средства 5-ASA, такие как, например: сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсазалин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и мезаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Шир, США; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Сольве).

В соответствии с описываемыми в настоящем документе способами салицилат, вводимый в комбинации с антителами к NKG2A с антителами к CTLA-4, и/или антителами

к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3 или без них, и неабсорбируемый стероид предусматривают любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида с целью снижения частоты возникновения колита, индуцированного иммуностимулирующими антителами. Так, например, способы снижения частоты возникновения колита, индуцированного иммуностимулирующими антителами, которые описаны в настоящем документе, предусматривают введение салицилата и неабсорбируемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 часов после неабсорбируемого стероида) или любой их комбинации. Кроме того, салицилат и неабсорбируемый стероид можно вводить одним и тем же путем (например, оба их вводят перорально) или различными путями (например, салицилат вводят перорально, а неабсорбируемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути(путей), применяемого(применяемых) для введения антитела к NKG2A и антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3.

Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A и комбинированные терапии антителами также можно применять в сочетании с другими хорошо известными терапевтическими средствами, которые подбирают по их конкретной полезности в отношении подвергаемого лечению состояния (например, рака). Комбинации описываемого в настоящем документе антитела к NKG2A можно применять последовательно с одним или несколькими известными фармацевтически приемлемыми средствами.

В соответствии с одним вариантом осуществления описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A и комбинированные терапии на основе антител можно применять в комбинации (например, одновременно или раздельно) с дополнительным способом лечения, таким как облучение, химиотерапия (например, с применением камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатин-паклитаксела (таксола), доксорубицина, 5-FU или камптотецина + apo2l/TRAIL (6X combo)), один или несколько ингибиторов протеасом (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитор индоламинадиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (R-(-)-производное госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклакс) или MCL-1 (антагонисты белка 1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонисты iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярные smac-миметики, синтетические smac-пептиды (см. Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722

(LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондезацетилазы), антитела к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, нацеленные на VEGF и VEGFR (например, AVASTIN®), синтетические тритерпеноиды (см. Hyer *et al.*, Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточных FLICE-ингибирующих белков) (например, природные и синтетические лиганды PPARγ (рецептора, активируемого пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналилдомид, ингибиторы GSK3β, ингибиторы IAP и/или генотоксические лекарственные средства.

Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A и комбинированные терапии на основе антител также применять в комбинации с одним или несколькими противопролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве противопролиферативных цитотоксических средств, включают без ограничения приведенные далее классы.

Алкилирующие средства (включая без ограничения азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™), мелфалан, хлорамбуцил, пипроброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (в том числе без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, пеностатин и гемцитабин.

Подходящими противопролиферативными средствами для комбинирования с антителами к NKG2A являются без ограничения таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен под названием TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорусид A, эпотилоны, эпотилон A, эпотилон B, эпотилон C, эпотилон D, эпотилон E, эпотилон F, фурноэпотилон D, дезоксиэпотилон Bl, [17]-дегидродезоксиэпотилон B, [18]-дегидродезоксиэпотилоны B, C12,13-циклопропилэпотилон A, C6-C8-мостиковый эпотилон A, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон B, эпотилон B10, дискодеромолид, патупилон (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (дискодеромолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), галихондрин B, эрибулина мезилат (E-7389), гемиастерлин (HTI-286), E-7974,

цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтанзиноида (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (испинезиб), SB-743921, MK-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-B-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, помимо других стабилизирующих микротубулин средств, которые известны из уровня техники.

В соответствии с некоторые вариантами осуществления может быть желательно сделать аберрантно пролиферирующие клетки неактивными в сочетании с лечением описываемыми в настоящем документе антителами к NKG2A или до такого лечения, например, путем введения пациенту гормонов и стероидов (в том числе синтетических аналогов), таких как 17a-этинилэстрадиол, диэтилстилбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолона пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоглютетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™. При использовании описываемых в настоящем документе способов или композиций в случае необходимости можно вводить и другие средства, применяемые при модуляции опухолевого роста или метастазирования в клинических условиях, такие как антимиметики.

Специалистам в настоящей области техники известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в Physicians' Desk Reference (PDR), например, издание 1996 года (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Химиотерапевтическое(химиотерапевтические) средство(средства) и/или лучевую терапию можно применять в соответствии с терапевтическими протоколами, которые известны в настоящей области техники. Специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что применение химиотерапевтического(химиотерапевтических) средства(средств) и/или лучевой терапии можно варьировать в зависимости от заболевания, от которого проводят лечение, и известных эффектов химиотерапевтического(химиотерапевтических) средства(средств) и/или лучевой терапии на такое заболевание. Также, в зависимости от осведомленности лечащего врача, терапевтические протоколы (например, величины дозировки и время применения) могут быть подвергнуты изменениям в свете наблюдаемых эффектов от применяемых на

пациенте терапевтических средств и в свете наблюдаемых ответов заболевания на применяемые терапевтические средства.

Результаты

Опухолевый ответ определяют, например, с помощью модифицированных критериев оценки ответа у солидных опухолей (RECIST), установленных NCI.

Что касается целевых очагов, ответы на терапию могут включать:

Полный ответ (CR) (RECIST V1.1)	Исчезновение всех целевых очагов. Любые патологические лимфатические узлы (либо целевые, либо нецелевые) должны иметь уменьшение короткой оси до <10 мм.
Частичный ответ (PR) (RECIST V1.1)	По меньшей мере на 30% уменьшение суммы диаметров целевых очагов, при этом за точку начал отсчета принимают сумму диаметров до начала лечения.
Прогрессирующее заболевание (PD) (RECIST V1.1)	По меньшей мере на 20% увеличение суммы диаметров целевых очагов, при этом за точку начала отсчета принимают наименьшую сумму при исследовании (сюда входит и сумма до начала лечения, если она является наименьшей при исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20% сумма также должна иметь абсолютное увеличение не менее на 5 мм. (Примечание: появление одного или нескольких новых очагов также считают прогрессированием).
Стабильное заболевание (SD) (RECIST V1.1)	Отсутствует как достаточное уменьшение опухолевой массы, чтобы квалифицировать как PR, так и достаточное увеличение, чтобы квалифицировать как PD, при этом за точку отсчета принимают наименьшую сумму диаметров во время исследования.
Полный ответ, связанный с иммунной системой (irCR) (irRECIST)	Исчезновение всех целевых очагов. Любые патологические лимфатические узлы (либо целевые, либо нецелевые) должны иметь уменьшение короткой оси до <10 мм.
Частичный ответ, связанный с иммунной системой (irPR) (irRECIST)	По меньшей мере на 30% уменьшение суммы диаметров целевых очагов и всех новых измеряемых очагов (например, процент изменения опухолевой нагрузки), при этом за точку отсчета

	принимают сумму диаметров до начала лечения. Примечание: появление новых измеряемых очагов учитывают в общей опухолевой нагрузке, но автоматически не квалифицируют как прогрессирующее заболевание, пока сумма диаметров не увеличится на 20% по сравнению с наиболее низким уровнем.
Прогрессирующее заболевание, связанное с иммунной системой (irPD) (irRECIST)	По меньшей мере на 20% увеличение опухолевой нагрузки (например, суммы диаметров целевых очагов и любых новых измеряемых очагов), при этом за точку начала отсчета принимают наименьшую сумму при исследовании (сюда входит и сумма до начала лечения, если она является наименьшей при исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма также должна иметь абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. Оценки опухолей с помощью иммунных критериев для прогрессирующего заболевания включают вклад новых измеряемых очагов. Каждый процент чистого изменения опухолевой нагрузки на оценку учитывает размер и кинетику роста как старых, так и новых очагов по мере их появления.
Стабильное заболевание, связанное иммунной системой (irSD) (irRECIST)	Отсутствует как достаточное уменьшение опухолевой массы, чтобы квалифицировать как irPR, так и достаточное увеличение, чтобы квалифицировать как irPD, при этом за точку отсчета принимают наименьшую сумму диаметров во время исследования.

Что касается нецелевых очагов, ответы на терапию могут включать:

Полный ответ (CR) (RECIST V1.1)	Исчезновение всех нецелевых очагов. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (<10 мм по короткой оси).
Не CR/не PD (RECIST V1.1)	Устойчивость одного или нескольких нецелевых очагов.
Прогрессирующее заболевание (PD) (RECIST V1.1)	*Однозначное прогрессирование* существующих нецелевых очагов. Появление одного или нескольких новых очагов также считают прогрессированием.

Полный ответ, связанный с иммунной системой (irCR) (irRECIST)	Исчезновение всех нецелевых очагов. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (<10 мм по короткой оси).
Прогрессирующее заболевание, связанное с иммунной системой (irPD) (irRECIST)	Увеличение количества или размера нецелевого(нецелевых) очага(очагов) не является прогрессирующим заболеванием, если/до тех пор, пока опухолевая нагрузка не увеличится на 20% (например, сумма диаметров при наиболее низком уровне целевых очагов и любых новых измеряемых очагов увеличивается на требуемую величину). Нецелевые очаги не рассматриваются в определении стабильного заболевания и частичного ответа.

Пациенты, которых лечат в соответствии с раскрытыми в настоящем документе способами, предпочтительно испытывают улучшение по меньшей мере по одному признаку рака. В соответствии с одним вариантом осуществления улучшение измеряют по уменьшению количества и/или размера измеряемых опухолевых очагов. В соответствии с другим вариантом осуществления очаги можно измерять на рентгенограммах грудной клетки или на CT- или MRI-пленках. В соответствии с другим вариантом осуществления для оценки восприимчивости к терапии можно использовать цитологию или гистологию.

В соответствии с одним вариантом осуществления у проходящего лечение пациента наблюдают полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), полный ответ, связанный с иммунной системой (irCR), частичный ответ, связанный с иммунной системой (irPR), или стабильное заболевание, связанное с иммунной системой (irSD). В соответствии с другим вариантом осуществления проходящий лечение пациент испытывает уменьшение опухолевой массы и/или уменьшение скорости роста опухоли, т. е. подавление опухолевого роста. В соответствии с другим вариантом осуществления уменьшается или ингибируется нежелательная клеточная пролиферация. В соответствии с еще одними вариантами осуществления может иметь место одно или несколько из следующего: может уменьшиться количество раковых клеток; может уменьшиться размер опухоли; может ингибироваться, задерживаться, замедлиться или остановиться инфильтрация раковых клеток в периферические органы; может замедлиться или ингибироваться метастазирование опухоли; может ингибироваться опухолевый рост; может быть предотвращен или отложен рецидив опухоли; до некоторой степени может быть облегчен один или несколько симптомов, связанных раком.

В соответствии с другими вариантами осуществления введение эффективных количеств антитела к NKG2A (или комбинаций антитела к NKG2A и по меньшей мере одного дополнительного антитела, например, антитела к PD-1 или антитела к CTLA-4) согласно любому из представленных в настоящем документе способов приводит к уменьшению размера опухоли, уменьшению количества метастатических очагов, появляющихся с течением времени, полной ремиссии, частичной ремиссии или к стабильному заболеванию. В соответствии с еще одними вариантами осуществления способы лечения дают сравнимый уровень клинической эффективности (CBR = CR+ PR+ SD $\geq$ 6 месяцев), который лучше, чем достигаемый при использовании антитела к NKG2A отдельно (или отдельно любого из входящего в комбинацию антител). В соответствии с другими вариантами осуществления улучшение уровня клинической эффективности составляет приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или более по сравнению с отдельно антителом к NKG2A (или с отдельно любым из входящего в комбинацию антителом).

Вакцинные адъюванты

Описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A можно применять для усиления антиген-специфических иммунных ответов путем совместного введения антитела к NKG2A с представляющим интерес антигеном, например, вакциной. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающим введение субъекту: (i) антигена; и (ii) антитела к NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента с тем, чтобы усилить у субъекта иммунный ответ на антиген. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают рассмотренные в разделах выше, такие как рассмотренные выше опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины) или антигены описанных выше вирусов, бактерий или других патогенов.

Детекция и диагностика

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам детекции наличия антигена NKG2A человека в образце или измерения количества антигена NKG2A человека, предусматривающим приведение образца и контрольного образца в контакт с антителом к NKG2A, например, моноклональным антителом к NKG2A человека или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с NKG2A

человека, в условиях, которые позволяют образовываться комплексу между антителом или его фрагментом и NKG2A человека. Затем детектируют образование комплекса, при этом различное образование комплекса между образцом относительно контрольного образца свидетельствует о наличии в образце антигена NKG2A человека. Более того, описываемые в настоящем документе антитела к NKG2A можно применять для очистки NKG2A человека посредством иммуноаффинной очистки.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано представленными далее примерами, которые не следует истолковывать как ограничивающие. Содержание всех фигур и всех литературных источников, последовательностей в GenBank, патентов и опубликованные заявок на выдачу патентов, которые упомянуты в настоящей заявке, однозначно включены в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Ниже представлены неограничивающие примеры антител к NKG2A, композиций и способов согласно настоящему изобретению. Понятно, что различные другие варианты осуществления могут быть практически реализованы в соответствии с общим описанием, представленным в настоящем документе.

Пример 1. Получение антител к huNKG2A

В настоящем раскрытии описаны полностью человеческие и химерные моноклональные антитела к NKG2A и полностью человеческие и химерные антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к NKG2A, и/или перекрестно блокируют связывание антител к NKG2A. Для авторов настоящего изобретения желательными являлись антитела, которые специфично связываются с клетками человека и яванского макака, экспрессирующими NKG2A, но не с клетками человека и яванского макака, экспрессирующими NKG2C. Антитела к NKG2A, описанные в настоящем документе, можно получать с применением нескольких способов, которые описаны в данном примере.

Способы получения, скрининга и отбора антител к NKG2A

1. Гибридомный способ и разработка

С помощью гибридомного способа получали антитела к NKG2A с применением трансгенных мышей, которые экспрессируют гены человеческих антител. Трансгенных по человеческому IgG куньминских (KM) мышей иммунизировали посредством инъекции в подушечку стопы плазматическими мембранами BAF3 (линия мышиных про-B-клеток) с человеческим NKG2A (BAF3-hNKG2A) и клетками с hCD94 или белком hNKG2A-hCD94-

mFc. Лимфатические узлы от этих мышей собирали и гибридомы получали с применением инструмента для электропорации CytoPulse, который использует электрические импульсы для повышения проницаемости клеточной мембраны, что обеспечивает возможность введения в клетку, например, ДНК. Антитела, специфичные в отношении человеческого NKG2A, отбирали при первичном скрининге с помощью технологии флуориметрического анализа в микрообъемах (FMAT) на основании их способности к связыванию с CHO-S с человеческим NKG2A. Вторичный подтверждающий скрининг с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS) осуществляли с целью идентификации моноклональных антител, которые специфично связываются с человеческим NKG2A, экспрессирующимся на клеточной поверхности трансфицированных CHO-S клеток.

Как показано на фиг. 1A, на стадии 101 40 слияний клеток лимфатических узлов, слитых с миеломной клеточной линией, давали на выходе 153 клона антител.

Затем на стадии 102 супернатанты от гибридом подвергали исследованию в отношении их способности блокировать связывание пентамера HLA-E (несущий флуоресцентную метку комплекс MHC-пептид, ProImmune) с экспрессирующими человеческий NKG2A клетками. В этом анализе идентифицировали антитела, которые были способны блокировать связывание пентамера HLA-E с экспрессирующими человеческий NKG2A клетками, и сужали спектр клонов антител для дальнейшей разработки со 153 до 28 клонов антител.

Затем специфичность в отношении антигена определяли посредством связывания очищенных антител с клетками человека или яванского макака, экспрессирующими NKG2A или экспрессирующими NKG2C. В частности, на стадии 103 28 клонов антител, которые блокировали взаимодействие HLA-E/NKG2A, подвергали дополнительному скринингу посредством связывания очищенных антител с клетками, экспрессирующими человеческий NKG2A, и подвергали скринингу в отношении связывания с экспрессирующими hCD94 или hNKG2C клетками. На этой стадии обнаружили три клона антител (13F3.A4, 11H9.A4 и 4G5.D1) и их отбирали для дальнейшего изучения.

На стадии 104 три клона антител (13F3.A4, 11H9.A4 и 4G5.D1) подвергали скринингу в отношении перекрестной реактивности с экспрессирующими NKG2A яванского макака клетками яичника китайского хомячка (CHO).

На стадии 105 различные функциональные анализы и эксперименты по группированию эпитопов, описанные в примерах в настоящем документе, применяли для характеристики антител к NKG2A.

На стадии 106 дополнительная оптимизация антител и анализ методом мутационного сканирования позволяли обнаружить дополнительные антитела к NKG2A с

желаемыми функциональными свойствами, которые описаны в настоящем документе.

2. Способ получения библиотеки антител

Дополнительно к гибридомному способу получения антител способ с использованием библиотек антител также применяли для получения дополнительных антител к NKG2A. С помощью данного способа получали антитела к NKG2A, в том числе антитела P1-069366, которые демонстрировали желаемое специфичное связывание с клеточными линиями, экспрессирующими как NKG2A человека, так и яванского макака, в то время как связывание с клетками, экспрессирующими человеческий NKG2C, преимущественно не наблюдалось.

В этом способе получения библиотеки, который показан на фиг. 1B, на стадии 107 девять трансгенных мышей, экспрессирующих человеческие антитела, иммунизировали рекомбинантным гибридным белком hNKG2A-hCD94-mFc и плазматическими мембранами от клеточной линии, экспрессирующей NKG2A яванского макака. На стадии 108 лимфатические узлы иммунизированных животных собирали и применяли для получения иммунной библиотеки антител. Эту библиотеку экспрессировали с помощью дисплея на поверхности клеток дрожжей и подвергали сортировке с применением флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS) в отношении антител, которые связываются с рекомбинантным белком hNKG2A-hCD94-mFc, но не с рекомбинантным белком hNKG2C-hCD94-mFc. На стадии 109 полученную в результате популяцию подвергали секвенированию с применением секвенирования нового поколения (NGS) и представляющие интерес антитела синтезировали и исследовали в анализах. На стадии 110 выполняли функциональную характеристику. Например, для характеристики антитела P1-069366 авторы настоящего изобретения с помощью FACS измеряли связывание антитела с клетками линии CHO, модифицированными с помощью методов генной инженерии для экспрессии человеческого NKG2A-CD94, NKG2A яванского макака или человеческого NKG2C-CD94. Кроме того, группирование эпитопов выполняли, например, для антитела 13F3.A4 и вариантов, в том числе антитела NKG2A.9, как описано в примерах в настоящем документе.

3. Способ клонирования отдельных B-клеток (SBCC)

Наряду с гибридомным способом и способом с использованием библиотек антител для получения антител к NKG2A третий способ применяли для получения более 200 дополнительных антител к NKG2A.

Антитела к huNKG2A получали с применением трансгенных мышей, которые экспрессируют гены человеческих антител. Этот способ SBCC применяли для получения

более чем 200 человеческих моноклональных антител к NKG2A. Как показано на фиг. 1C, на стадии 111 трансгенных по человеческому IgG (KM) мышей иммунизировали посредством инъекции в подушечку стопы плазматическими мембранами клеток линии BAF3, экспрессирующих человеческий NKG2A и NKG2A яванского макака, соответственно, и белком hNKG2A-hCD94-mFc. На стадии 112 лимфатические узлы от этих мышей собирали и полученные клетки применяли для способа SBCC. На стадии 113 $10x10^6$ клеток лимфатических узлов выделяли из лимфатических узлов. На стадии 114 отбор/сортировка антиген-специфических B-клеток основывалась на экспрессии человеческого IgG на клеточной поверхности, и авторы настоящего изобретения преимущественно применяли проточную цитометрию для сортировки положительных по антигену (Ag+) B-клеток. Лимфатические узлы иммунизированных животных собирали и применяли для выделения антигенспецифических B-клеток, то есть B-клеток, специфичных в отношении NKG2A.

Используемая авторами настоящего изобретения стратегия FACS окрашивания требовала применения растворимого антигена-мишени, который несет флуоресцентную метку/биотинилирован, и включала в себя панель экспрессирующихся маркеров клеточной поверхности, специфических для B-клеток, например, мышиный CD19, мышиный B220 и человеческий IgG. Этот мультипараметрический FACS анализ успешно привел в результате к идентификации и сортировке специфичных в отношении NKG2A B-клеток. Селективное FACS окрашивание приводило в результате к выделению B-клеток, положительных по рекомбинантному белку hNKG2A-hCD94-mFc, но не по рекомбинантному белку hNKG2C-CD94-Fc. Гены VH и VK человеческого IgG из этих отсортированных B-клеток подвергали амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулы экспрессировали в виде рекомбинантного человеческого IgG1. Полученные таким образом антитела исследовали в анализах связывания, таких как ELISA, HTRF и FACS.

Целью являлось получение антител, которые специфично связываются с белком NKG2A, но не с NKG2C. Авторы настоящего изобретения идентифицировали некоторые антитела, которые специфично связываются с NKG2A, и некоторые, которые являлись отрицательными в отношении NKG2C. Идентифицировали очень небольшое количество клонов (редких) B-клеток, которые проявляли перекрестную реактивность с NKG2A яванского макака и человека и являлись отрицательными в отношении NKG2C. NGS (секвенирование нового поколения) выполняли на полученных с помощью SBCC клонах B-клеток с получением данных секвенирования VH и VK человеческого IgG. Отобранную панель специфичных в отношении NKG2A антител подвергали исследованию для дополнительных анализов. Тем не менее, ни один из клонов не блокировал в достаточной

степени взаимодействие человеческого NKG2A/HLA-E, поэтому эти антитела не использовали для дальнейшей разработки, как более подробно обсуждается в примере 3(2) ниже.

Пример 2. Мутационное сканирование и другие процедуры оптимизации антител

Проводили мутационное сканирование, при котором библиотека мутаций по одному сайту генерировала дополнительные варианты антител к NKG2A, в том числе антитело NKG2A.11 (также известное как 13F3.A4 VH I107T, VK N30P).

На фиг. 2 проиллюстрирован анализ методом мутационного сканирования. Секвенирование с высокой пропускной способностью комбинировали с дисплеем белков для обеспечения возможности одновременного измерения относительного соответствия каждого возможного мутанта по одному сайту CDR в масштабе, который был бы затруднителен в случае более традиционного подхода. Подходы глубокого мутационного сканирования были описаны в Araya *et al.*, Trends in Biotechnology 29: 435-442 (2001); Forsynth *et al.*, mAbs 5:523-53 (2013); и Wrenbeck et al. (2017) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 45:36.

Во-первых, на стадии 201 представляющее интерес антитело подвергали отбору, создавая мутации в антителе. В частности, отобрали антитело к NKG2A 13F3.A4 I107T. Связывающий паратоп полученного с помощью гибридомы антитела к NGK2A 13F3.A4 I107T изучали с применением глубокого мутационного сканирования. Во-вторых, на стадии 202 создавали библиотеку scFv (одноцепочечных фрагментов), в которых каждую отдельную аминокислотную замену в участке CDR1 легкой цепи (LCDR1), участке CDR3 легкой цепи (LCDR3) и участках CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) создавали с применением олигонуклеотидов NNK. Эту библиотеку мутантов по одной аминокислоте секвенировали с применением методик секвенирования нового поколения (NGS). При создании этой библиотеки мутантов по одной аминокислоте для каждой последовательности CDR конструировали несколько олигонуклеотидов, которые по отдельности встраивали кодон NNK в каждом положении, где N=A, C, G, T, и K=G, T. Применение этих вырожденных кодонов позволяло кодировать все 20 природных аминокислот (а также стоп-кодон) в положении, в которое встраивали кодон NNK. Определение по Kabat применяли для всех CDR, за исключением HCDR1, для которого применяли определение AbM (Abhinandan and Martin (2008) *Mol. Immunol.* 45:3832; Swindells et al. (2017) *J. Mol. Biol.* 429:356), и положение 102 в HCDR3 не включали в анализ. В-третьих, на стадии 203 при применении дисплея мРНК (Xu L et al. (2002) *Chemistry & Biology* 9: 933; Roberts RW and JW Szostak (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297; Kurz

et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(18): E83) библиотеку ДНК проводили через один раунд транскрипции и трансляции *in vitro*, в ходе которого кодирующую мРНК сливали с ее собственной молекулой белка scFv через пуромициновый мостик. В ходе отбора любые scFv, которые связываются с меченым биотином гибридным белком hNKG2A-hCD94-mFc, захватывали с помощью магнитных гранул со стрептавидином, элюировали и амплифицировали с помощью ПЦР (стадия 205). Как показано на стадии 204 антитела, которые не связывались с человеческим NKG2A, не отбирали для дальнейшего исследования и разработки. Наконец, на стадии 206 исходную библиотеку, образованную на стадии 202, и элюированную ДНК со стадии 205 секвенировали с применением секвенирования нового поколения (NGS).

Анализ данных секвенирования нового поколения (NGS). В ходе анализа данных NGS последовательности прямых и обратных ридов со спаренными концами от NGS собирали с применением FLASH (Magoc and Salzberg (2011) *Bioinformatics* 27:2957) и группировали в соответствии с популяцией, положением мутации и идентичностью мутированной аминокислоты. Все последовательности плохого качества и последовательности, содержащие несколько сайтов с мутацией исключали из анализа. Затем частоту каждой последовательности в популяции после отбора делили на частоту в исходной популяции с получением коэффициента обогащения (ER). Иначе говоря, коэффициент обогащения представляет собой подсчитанное количество конкретного варианта последовательности в связавшемся с NKG2A образце (стадия 205), поделенное на подсчитанное количество в исходной библиотеке (стадия 202). Его затем нормализовали к коэффициенту обогащения для исходного антитела 13F3.A4 I107T:

$$\text{Коэффициент обогащения} = \frac{\text{Частота после отбора (стадия 205)}}{\text{Частота в исходной библиотеке (стадия 202)}}$$

➔ Нормализовать к исходному значению в каждом положении

Таким образом оценивали воздействие на связывание с NKG2A каждой отдельной аминокислотной замены в участках CDR, как обсуждается в настоящем документе. На фиг. 3 представлена иллюстративная теплокарта, которую получали с применением анализа данных мутационного сканирования, и она обеспечивает возможность интерпретации взаимосвязи последовательность-активность для отдельных аминокислотных замен. Показана последовательность HCDR1 (определение AbM) у исходного клона 501, а также показано положение в последовательности 502. В целом, погрешность в этом способе является примерно двукратной. Следовательно, значения коэффициента обогащения (ER) от 0,5 до 2 рассматриваются как нейтральные замены, *m.e.* замены, которые сохраняют

свойства в отношении белка NKG2A. Значения ER, большие чем 2, рассматриваются как благоприятные или предпочтительные для связывания, а значения ER, меньшие чем 0,5, рассматриваются как неблагоприятные для связывания. В качестве примера замена N в положении 35 у исходного клона на S дает в результате значение ER 5,16, что составляет более чем 2 и, следовательно, является примером благоприятной или предпочтительной замены.

Положения в CDR, которые анализировали с применением метода мутационного сканирования, представлены на фиг. 4. Как обсуждается в настоящем документе, определение по Kabat применяли для всех CDR, за исключением HCDR1, для которого применяли определение AbM. В случае разработки антитела к NKG2A с желаемыми биофизическими свойствами данные мутационного сканирования применяли для удаления химического недостатка в виде предрасположенности к дезамидированию «NS» в LCDR1 посредством идентификации аминокислотных замен, которые будут сохранять аналогичное связывание с белком NKG2A, как и антитело 13F3.A4 I107T. Исходя из этого анализа, как показано на фиг. 5A, N30P в LCDR1 выбрали в качестве предпочтительной (благоприятной) замены и получали антитело NKG2A.11 (также известное как 13F3 VH I107T VK N30P). Эту молекулу синтезировали и клонировали в вектор экспрессии IgG с человеческим Fc участком IgG1.3f и человеческим константным участком каппа-цепи (легкой цепи). Белок IgG экспрессировали для последующей характеристики в дальнейших исследованиях.

Анализ методом мутационного сканирования обеспечивал ценный набор информации о воздействии отдельных аминокислотных замен в антителе к NKG2A 13F3.A4 I107T на связывание с белком NKG2A, как показано на фиг. 5A-E и кратко изложено в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Мутации по одному сайту в последовательностях CDR в антителе к NKG2A 13F3.A4 I107T, которые сохраняют или повышают способность антитела к связыванию с NKG2A.

Участок CDR	**Положение** (согласно определению по Kabat, за исключением HCDR1, для которого используют определение AbM)	**Предпочтительные замены, которые сохраняют или повышают связывание с NKG2A** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)	**Аминокислоты, которые сохраняют связывание с NKG2A, в том числе исходная аминокислотная последовательность** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)
LCDR1	24, X_1		G, A, C, S, T, V, L, I, M, K, R (исходная), H,

Участок CDR	**Положение** (согласно определению по Kabat, за исключением HCDR1, для которого используют определение AbM)	**Предпочтительные замены, которые сохраняют или повышают связывание с NKG2A** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)	**Аминокислоты, которые сохраняют связывание с NKG2A, в том числе исходная аминокислотная последовательность** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)
			F, Y, W, N, D, E, Q
	25, X_2	C, T, V, M	P, G, A (исходная), S, L, I, F, Y, N, E, Q
	26, X_3		P, G, A, C, S(исходная), T, V, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q
	27, X_4	G	P, A, C, S, T, V, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q (исходная)
	28, X_5	L	P, A, C, S, T, V, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q, G (исходная)
	29, X_6	C, H, F, N, D, E	P, G, A, S, T, V, L, I (исходная) M, K, R, Y, W, Q
	30, X_7	P	G, A, C, S, T, V, L, I, M, K, H, F, Y, W, N (исходная), D, E, Q
	31, X_8	P, G, C, D, E	A, S (исходная), T, L, I, M, H, F, Y, W, N, Q
	32, X_9	V, I, F, Y, D, E	G, A (исходная), C, S, T, L, M, H, W, N
	33, X_{10}		A, C, T, V, L (исходная), I
	34, X_{11}	E	A (исходная), T, V
LCDR3	89, X_{12}		Q (исходная)
	90, X_{13}	D	A, S, T, K, N, E, Q (исходная)
	91, X_{14}	C, M, H, W, N	A, T, L, F (исходная)
	92, X_{15}		P, A, C, S, I, H, F, Y, W, N (исходная), D, E, Q

Участок CDR	**Положение** (согласно определению по Kabat, за исключением HCDR1, для которого используют определение AbM)	**Предпочтительные замены, которые сохраняют или повышают связывание с NKG2A** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)	**Аминокислоты, которые сохраняют связывание с NKG2A, в том числе исходная аминокислотная последовательность** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)
	93, X_{16}	V, D, E	G, A, C, S (исходная), T, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, Q
	94, X_{17}		M, H, F, Y (исходная), W
	95, X_{18}		P (исходная), G, A, S, M, D, E, Q
	96, X_{19}		C, L (исходная), F, W
	97, X_{20}		G, A, C, S, T (исходная), V, I, M, K, H, F, Y, W, N, D, E, Q
HCDR1	26, X_{21}		G (исходная)
	27, X_{22}		F (исходная)
	28, X_{23}	V	G, A, C, S, T (исходная), L, I, M, K, R, H, F, Y, N, D, E, Q
	29, X_{24}		F (исходная)
	30, X_{25}	G, N	P, A, C, S (исходная), M, K, R, H, D, E, Q
	31, X_{26}	G, A, V	S (исходная), T, E, Q
	32, X_{27}		H (исходная)
	33, X_{28}	C	A, S (исходная), M, K, R
	34, X_{29}		M (исходная)
	35, X_{30}	G, A, S	T, V, N (исходная), D
HCDR2	50, X_{31}	S, Q	G, A (исходная), C, L, M, K, F, D
	51, X_{32}	A	S, V, L, I (исходная), M, N, E, Q
	52, X_{33}		S (исходная)
	52a, X_{34}	C	S (исходная)

Участок CDR	**Положение** (согласно определению по Kabat, за исключением HCDR1, для которого используют определение AbM)	**Предпочтительные замены, которые сохраняют или повышают связывание с NKG2A** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)	**Аминокислоты, которые сохраняют связывание с NKG2A, в том числе исходная аминокислотная последовательность** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)
	53, X_{35}	Q	S (исходная)
	54, X_{36}		S (исходная)
	55, X_{37}	F, Y, W	A, C, S (исходная), T, M, R, H
	56, X_{38}		Y (исходная)
	57, X_{39}		I (исходная)
	58, X_{40}		G, A, S, M, K, R, H, F, Y (исходная), N, E, Q
	59, X_{41}		G, S, T, V, M, R, H, F, Y (исходная), W, N, Q
	60, X_{42}	H, Q	P, G, A (исходная), C, S, T, V, L, I, M, K, R, F, Y, W, N, D, E
	61, X_{43}		P, G, A, C, S, T, V, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D (исходная), E, Q
	62, X_{44}		P, G, A, C, S (исходная), T, V, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q
	63, X_{45}		P, G, A, C, S, T, V (исходная), L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q
	64, X_{46}		P, G, A, C, S, T, V, L, I, M, K (исходная), R, H, F, Y, W, N, D, E, Q
	65, X_{47}		P, G (исходная), A, C, S, T, V, L, I, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q
HCDR3	95, X_{48}		E (исходная)
	96, X_{49}		M, E (исходная)
	97, X_{50}		W (исходная)

Участок CDR	**Положение** (согласно определению по Kabat, за исключением HCDR1, для которого используют определение AbM)	**Предпочтительные замены, которые сохраняют или повышают связывание с NKG2A** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)	**Аминокислоты, которые сохраняют связывание с NKG2A, в том числе исходная аминокислотная последовательность** (теплокарты представлены на фиг. 5A-E)
	98, X_{51}		G (исходная)
	99, X_{52}		S, L (исходная), H
	100, X_{53}		P (исходная)
	100a, X_{54}		F (исходная)
	101, X_{55}		D (исходная)

При использовании данных мутационного сканирования на всю глубину квалифицированный специалист в данной области техники поймет, что много положений аминокислот, которые показаны в данных на фиг. 5A-E, являются толерантными к мутации, это означает, что в этих положениях могут быть выполнены аминокислотные замены, и при этом все еще сохраняется желаемая функциональная способность к специфичному связыванию с белком NKG2A. Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что определенные положения, например, положение 89 в LCDR (которое показано на фиг. 5B), а также положения 26, 27, 29, 32 и 34 в HCDR (которые показаны на фиг. 5C); положения 52, 52a, 53, 54, 56, 57 в HCDR (которые показаны на фиг. 5D) и положения 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a и 101 в HDCR (которые показаны на фиг. 5E) являлись наиболее консервативными, причем только один или небольшое число типов аминокислот в этих положениях поддерживали связывание с белком NKG2A. Специалист в данной области техники будет способен спланировать аминокислотные замены при использовании этих данных для сохранения связывания с белком NKG2A.

Пример 3. Обнаружение антител к NKG2A с желаемыми неожиданными функциональными характеристиками после анализа сотен антител, которые не демонстрировали такие характеристики.

(1) Обнаружение, конструирование и экспериментальное исследование антител к NKG2A

Не выполняли разработку сотен антител к NKG2A, поскольку антитела не проявляли определенные желаемые функциональные свойства, которые описаны в настоящем

документе. Эта сложность в обнаружении антител к NKG2A с желаемыми функциональными свойствами была отчасти обусловлена высокой гомологией последовательности между белками человеческого NKG2A и человеческого NKG2C, что проиллюстрировано на фиг. 6. Выравнивание последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения Vector NTI и программы Align X. На фиг. 6 показано, что 76% аминокислотных остатков (177 из 233 аминокислотных остатков) являются консервативными, и 6% аминокислотных остатков (13 из 233 аминокислотных остатков) являются подобными у канонической последовательности человеческого белка NKG2A (SEQ ID NO: 182) и человеческого белка NKG2C (hNKG2C, SEQ ID NO: 3).

В уровне техники хорошо известно, что в природе существует 20 разных аминокислот, и что аминокислоты могут быть сгруппированы в различные классы и, следовательно, являются «подобными», исходя из их физико-химических свойств. Аминокислоты, которые являются подобными в плане физико-химических свойств, часто являются более взаимозаменяемыми, то есть могут быть заменены друг на друга, чем аминокислоты, которые не являются подобными в плане физико-химических свойств. В следующей таблице представлены группы аминокислот, которые имеют подобные характеристики, которые определяются, например, их боковыми цепями:

Характеристика аминокислоты		**Примеры**		
Полярные	Полярные, положительно заряженные	Аргинин	Arg	R
		Гистидин	His	H
		Лизин	Lys	K
	Полярные, отрицательно заряженные	Аспарагиновая кислота	Asp	D
		Глутаминовая кислота	Glu	E
	Полярные, нейтральные	Серин	Ser	S
		Треонин	Thr	T
		Аспарагин	Asn	N
		Глутамин	Gln	Q
Неполярные	Неполярные алифатические	Аланин	Ala	A
		Валин	Val	V
		Лейцин	Leu	L
		Изолейцин	Ile	I
		Метионин	Met	M
	Неполярные ароматические	Фенилаланин	Phe	F
		Тирозин	Tyr	Y
		Триптофан	Trp	W
		Пролин	Pro	P
		Глицин	Cys	C
Специальные характеристики		Аспарагин/ Аспартат	Asx	
		Глутамин/ Глутамат	Glx	

*Глицин не имеет боковой цепи, и его классификация не является однозначной. Глицин обычно находится на поверхности белка в участках петель или спиралей, что обеспечивает высокую гибкость полипептидной цепи в этих местах.

Подводя итог, следует отметить, что человеческий NKG2A и человеческий NKG2C имеют примерно 82% одинаковых или подобных аминокислотных последовательностей. Эта высокая гомология последовательностей между человеческим NKG2A и человеческим NKG2C делает очень сложным процесс обнаружения антител к NKG2A, которые не только связываются с высокой аффинностью и специфичностью с белком NKG2A, но также связываются с низкой аффинностью и специфичностью с белком NKG2C или не обладают аффинностью и специфичностью в отношении белка NKG2C.

Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитело 13F3.A4 демонстрировало определенные желаемые функциональные характеристики, которые подробно описаны в настоящем документе. На фиг. 7A-B представлены аминокислотные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи (фиг. 7A) и вариабельного участка легкой цепи (фиг. 7B) у антител к NKG2A 13F3.A4. В доказательство сложности обнаружения антител к NKG2A, которые демонстрировали желаемые функциональные характеристики, например, для лечения рака, даже несколько вариантов антитела 13F3.A4, которые вначале рассматривали как потенциальные ведущие антитела, в конечном итоге не демонстрировали желаемые функциональные свойства. В **таблице 2** кратко изложена информация об определенных антителах к NKG2A, в том числе о вариантах антитела 13F3.A4, которые получали и характеризовали их функциональные свойства. Определенные варианты антитела 13F3.A4, в том числе антитело NKG2A.9, неожиданно демонстрировали желаемые функциональные характеристики, описанные в настоящем документе.

Таблица 2. Антитело к NKG2A и функциональная характеристика

Исходный клон гибридомы	Название рекомбинантного антитела	Изотип антитела	Описание и функциональная характеристика
11H9.A4	NKG2A.5	IgG1f	• Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E • Исследовано в анализе связывания с CHO-NKG2A яванского макака. • NKG2A.5 продемонстрировало слабое связывание с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками и не использовалось в дальнейшей разработке. • На фиг. 9A-9B представлены последовательности вариабельного участка тяжелой цепи и легкой цепи антитела 11H9.
11H9.A4	NKG2A.5	IgG1.3f	• Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E • Исследовано в анализе связывания с CHO-NKG2A яванского макака. Продемонстрировало слабое связывание с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками и не использовалось в дальнейшей разработке.
13F3.A4	NKG2A.6	IgG1.3f и IgG1f	• Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E. NKG2A.6 (исходное антитело, например, для NKG2A.9 и NKG2A.11) блокировало взаимодействие hNKG2A/HLA-E. • Исследовано в анализе связывания с CHO-NKG2A яванского макака. NKG2A.6 (исходное антитело, например, для NKG2A.9 и NKG2A.11) связывалось с NKG2A яванского макака • На основании результатов анализа антитело NKG2A.6-IgG1.3f использовали в дальнейшей разработке, и оно привело к обнаружению и разработке, например, антител NKG2A.9 и NKG2A.11-IgG1.3f.

13F3.A4	NKG2A.6	IgG2.5	• Антитело к NKG2A 13F3.A4 с человеческим IgG2-C131S (оптимизированное по кодонам) • Не исследовалось в каких-либо анализах
13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S	NKG2A.9	IgG1.3f	• 13F3.A4 с FW возвратной мутацией VH-I107T и VK-N30S для удаления сайта дезамидирования (оптимизированное по кодонам) • Обнаружено и охарактеризовано в многочисленных функциональных анализах, как описано в примерах в настоящем документе, и неожиданно проявляло желаемые функциональные характеристики. • На фиг. 15 представлены аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи антитела NKG2A.9.
13F3.A4 VH-I107T, VK-N30Q	NKG2A.10	IgG1.3f	• 13F3.A4 с FW возвратной мутацией VH-I107T и VK-N30Q для удаления сайта дезамидирования • Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E и анализе связывания с CHO-hNKG2A
13F3.A4 VH-I107T, VK-N30P	NKG2A.11	IgG1.3f	• 13F3.A4 с FW возвратной мутацией VH-I107T и VK-N30P для удаления сайта дезамидирования • Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E и анализе связывания с CHO-hNKG2A
13F3.A4 VH-I107T	NKG2A.12	IgG1.3f	• 13F3.A4 с FW возвратной мутацией VH-I107T • Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E и анализе связывания с CHO-hNKG2A
13F3.A4 VK-N30S	NKG2A.13	IgG1.3f	• 13F3.A4 с N30S для удаления сайта дезамидирования • Не исследовалось в каких-либо анализах вследствие того, что антитело NKG2A.13 не было получено с достаточным выходом.

13F3.A4 VK-N30Q	NKG2A.14	IgG1.3f	• 13F3.A4 с N30Q для удаления сайта дезамидирования • Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E и анализе связывания с CHO-hNKG2A
13F3.A4 VK-N30P	NKG2A.15	IgG1.3f	• 13F3.A4 с N30P для удаления сайта дезамидирования • Исследовано в анализе блокирования CHO-hNKG2A/HLA-E и анализе связывания с CHO-hNKG2A
2G6.C2	NKG2A.16	IgG1.3f и IgG1f-Fab6H	• Исследовано в анализе связывания с CHO-NKG2A яванского макака. • Антитело продемонстрировало слабое связывание с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками и не использовалось в дальнейшей разработке. • Антитело также демонстрировало повышенную функциональность в клетках, отрицательных в отношении экспрессии NKG2A, что говорит о том, что антитело не оказывает непосредственное воздействие на путь NKG2A/HLA-E. • На фиг. 8A-B представлены аминокислотные последовательности тяжелой цепи (фиг. 8A) и легкой цепи (фиг. 8B) антитела 2G6.C2.
13F3 VH-I107T, VK-N30S-Y49S	NKG2A.18	IgG1.3f	• Мутантов с гидрофобными участками получали для пробы, а также для того, чтобы снизить нежелательные уровни агрегации. • Ни одного из мутантов с гидрофобными участками не исследовали в каких-либо анализах.
13F3 VH-I107T, VK-N30S-Y94T	NKG2A.19		
13F3 VH-I107T, VK-N30S-Y94A	NKG2A.20		

13F3 VH-I107T, VK-N30S-Y94N	NKG2A.21		
13F3 VH-Y56T-I107T, VK-N30S	NKG2A.22		
13F3 VH-I57T-I107T, VK-N30S	NKG2A.23		
13F3 VH-Y58N-I107T, VK-N30S	NKG2A.24		
13F3 VH-Y58S-I107T, VK-N30S	NKG2A.25		
27H4.D4	NKG2A.17	mIgG1-D265A	• 27H4.D4 повторно экспрессировали в виде NKG2A.17 - химерного антитела с мышиным IgG1-D265A и мышиными константными участками каппа-цепи. • Антитело 27H4.D4 представляет собой неконкурирующее антитело, которое создавали для связывания с рецептором NKG2A в присутствии представляющего интерес антитела к NKG2A, т.е. создавали для связывания с те же антигеном, что и целевое антитело (в данном случае с NKG2A), но не с тем же эпитопом. Оно обеспечивало возможность измерения экспрессии рецептора NKG2A в присутствии представляющего интерес антитела к NKG2A.

По причинам, описанным в настоящем документе, и как продемонстрировано многочисленными антителами к NKG2A, которые не отбирали для дальнейшей разработки вследствие нежелательных функциональных характеристик, получение и обнаружение антител к NKG2A с желаемыми функциональными свойствами является крайне сложным процессом. Например, даже в ходе поздних стадий разработки антитела к NKG2A антитела 2G6.C2, 4G5.D1, 11H9.A4 и 1G5.B2, которые первоначально рассматривались как возможные ведущие антитела, в конечном итоге не отбирали для дальнейшей разработки, поскольку они не демонстрировали все из желаемых функциональных свойств. На фиг. 8A-B представлены последовательности вариабельного участка тяжелой и легкой цепи антитела 2G6.C2. На фиг. 9A-B представлены последовательности вариабельного участка тяжелой и легкой цепи антитела 11H9.A4. На фиг. 10A-B представлены последовательности вариабельного участка тяжелой и легкой цепи антитела 4G5.D1. На фиг. 11A-B представлены последовательности вариабельного участка тяжелой и легкой цепи антитела 1G5.B2. Эти примеры, среди прочих, описанных в настоящем документе, демонстрируют сложность получения антител к NKG2A с желаемыми функциональными характеристиками, включающими специфичное связывание с белком NKG2A, но не с белком NKG2C. Как объясняется в настоящем документе, часть сложностей в обнаружении антител к NKG2A с желаемыми функциональными свойствами были обусловлены высокой гомологией последовательности между белками человеческого NKG2A и человеческого NKG2C.

Изучали варианты антитела 13F3.A4 и подвергали их дальнейшей характеристике. Как показано на фиг. 12-13, недостатки последовательности оценивали у антитела 13F3.A4. Вариабельную последовательность полностью человеческого моноклонального антитела к NKG2A NKG2A.9 получали из гибридомы 13F3.A4 с обратной мутацией в эмбриональный тип VH-I107T и с мутацией VK-N30S для уменьшения недостатка в виде предрасположенности к дезамидированию по остатку VK-N30. Константный участок получали из остова IgG1f (IgG1.3), и он включает в себя три мутации на тяжелой цепи: L234A, L235E и G237A, для сведения к минимуму или исключения связывания антитела с Fcγ рецепторами и C1q. Окисление по M34 идентифицировали в качестве потенциального фактора риска окисления, но данный риск затем исключили на основании последующих исследований стабильности в условиях ускоренной деградации. Полноразмерная аминокислотная последовательность антитела NKG2A.9 представлена на фиг. 14. Антитело NKG2A.9 отбирали и исследовали в многочисленных функциональных анализах, которые описаны в настоящем документе, чтобы показать безопасность и эффективность отдельно и в комбинации с другими средствами для лечения, например, рака.

Полноразмерная аминокислотная последовательность антитела NKG2A.11 представлена на фиг. 15. NKG2A.11 получено из 13F3.A4 с возвратной мутацией VH-I107T в каркасном участке и с VK-N30P для удаления сайта дезамидирования. Различие по одной аминокислоте присутствует между NKG2A.9 (N30S) и NKG2A.11 (N30P) в легкой цепи, и различия по аминокислотам отсутствуют в тяжелой цепи. NKG2A.9 и NKG2A.11 характеризуются сходной термической стабильностью и свойствами растворимости. NKG2A.9 характеризуется лучшей обратимостью денатурации при нагревании и лучшей иммуногенностью (*in silico*), чем NKG2A.11. Иммуногенность NKG2A.9 более подробно описана в примерах 16 и 26.

(2) Сотни антител, полученных с применением способа клонирования отдельных B-клеток, у которых отсутствовали желаемые функциональные характеристики

На фиг. 16 представлена круговая диаграмма результатов группирования эпитопов для иллюстративных антител, полученных с помощью способа клонирования B-клеток. Группирование эпитопов осуществляли на инструменте Octet HTX с применением «тандемного формата». Во-первых, гибридный белок hNKG2A-hCD94-mFc захватывали на наконечниках датчика Octet. Затем оставшиеся сайты для захвата блокировали, если требовалось. В-третьих, антиген насыщали полученными в результате клонирования отдельных B-клеток антителами из супернатанта. Наконец, исследовали связывание сравнительных антител. Эксперимент по группированию эпитопов повторяли при обратном порядке добавления с насыщением вначале сравнительными антителами, а затем зондированием в отношении связывания супернатанта, содержащего антитела, полученные в результате клонирования отдельных B-клеток. Это группирование эпитопов показало высокое разнообразие в характере связывания и блокирования, соответствующее высокому разнообразию эпитопов. На фиг. 16 изображены результаты группирования эпитопов, показывающие антитела, которые перекрестно блокируют друг друга, соединенными линией. Антитела в образце, которые характеризуются подобным профилем блокирования по сравнению с эталонными антителами (13F3.A4, Z270, RD-ahNKG2a (клон 131411, № в каталоге MAB1059) и RD-ahCD94 (клон 131412, № в каталоге MAB1058)), объединяют вместе в группы 1-4, 6-7 и 9. Эталонные антитела с подобными профилями блокирования, как у наборов антител в образце, также объединяют вместе в группы 5, 8 и 10. Антитела в одной и той же группе также потенциально могут перекрестно блокировать друг друга, но это не исследовали в этих экспериментах. Антитела в образце не исследовали друг относительно друга и эталонные антитела не исследовали друг относительно друга в отношении перекрестного блокирования.

Оценивали способность антител к человеческому NKG2A, полученных с

применением способа клонирования отдельных B-клеток, к блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E. Как показано на фиг. 17A, 1×10^6 экспрессирующих человеческий NKG2A CHO клеток инкубировали со 100 мкл супернатанта или 10 мкг/мл очищенного антитела в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку пентамером HLA-E (Proimmune) для выявления связанного HLA-E на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 17B представлена способность антител к человеческому NKG2A, полученных посредством клонирования B-клеток, блокировать связывание HLA-E с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками. Антитело NKG2A.9 служило в качестве положительного контроля, и изотипический контроль служил в качестве отрицательного контроля. Сотни антител, полученных с применением способа SBCC, лишь частично блокировали или вовсе не блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E. Ни одно из этих сотен антител не отбирали для дальнейшей разработки, что является доказательством сложности обнаружения антител к NKG2A с желаемыми функциональными характеристиками.

(3) Антитела к человеческому NKG2A, которые в соответствии с желаниями блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E, но не взаимодействие NKG2C/HLAE

Оценивали способность антител к человеческому NKG2A к блокированию взаимодействий NKG2A/HLA-E и NKG2C/HLA-E. Как показано на фиг. 18D, 1×10^6 экспрессирующих человеческий NKG2A CHO клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку пентамером HLA-E (Proimmune) для выявления связанного HLA-E на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 18E-F показана кривая блокирования HLA-E и IC_{50} у антител к NKG2A при блокировании связывания HLA-E с экспрессирующими человеческий NKG2A или экспрессирующими человеческий NKG2C CHO клетками. Антитела 13F3.A4 и 11H9.A1 в соответствии с желаниями демонстрировали желаемое специфичное связывание с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками (фиг. 18E) и в соответствии с желаниями не блокировали взаимодействие NKG2C/HLA-E (фиг. 18F). Тем не менее, антитело 2EB.B1 нежелательно связывалось с экспрессирующими человеческий NKG2C CHO клетками и блокировало взаимодействие NKG2C/HLA-E. Следовательно, антитело 2EB.B1 не отбирали для дальнейшей разработки.

Также оценивали способность антител к NKG2A к блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E в клетках-натуральных киллерах (NKL). Как показано на фиг. 19C, 1×10^6

эндогенно экспрессирующих человеческих NKL клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку пентамером HLA-E (Proimmune) для выявления связанного HLA-E на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 19D показана кривая блокирования HLA-E и значения IC_{50} у антител к NKG2A при блокировании связывания HLA-E с экспрессирующими человеческий NKG2A NKL клетками. Антитела 13F3.A4, 11H9.A1, 4G5.D1 и IG5.B2 демонстрировали блокирование взаимодействия NKG2A/HLA-E в NKL клетках со значениями IC_{50}, составляющими 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,3 нМ и 0,4 нМ, соответственно.

Оценивали способность дополнительных антител к человеческому NKG2A к блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E. Как показано на фиг. 20A, 1×10^6 экспрессирующих человеческий NKG2A CHO клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A (10 мкг/мл) в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку пентамером HLA-E (Proimmune) для выявления связанного HLA-E на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 20B-C показана кривая блокирования HLA-E и значения IC_{50} у антител к человеческому NKG2A для их способности блокировать связывание HLA-E с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками. Как показано на фиг. 20B, все из антител NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14 и NKG2A.15 демонстрировали относительно низкие значения IC_{50} (0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ и 0,1 нМ, соответственно), что указывало на то, что антитела блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E. Аналогично, как показано на фиг. 20C, антитела NKG2A.5, 4G5.D1 и 1G5.B2 демонстрировали относительно низкие значения IC_{50}, составляющие 0,3 нМ, 0,9 нМ и 0,7 нМ, соответственно. Следовательно, эти антитела отбирали для дальнейшей разработки. Тем не менее, как описано в настоящем документе, антитела NKG2A.5 и 4G5.D1 впоследствии исключили из дальнейшей разработки вследствие их слабого связывания с белком NKG2A яванского макака.

Как показано на фиг. 20C, антитело 25E7.G8 (обозначено закрашенным кругом), тем не менее, не блокировало взаимодействие NKG2A/HLA-E, что продемонстрировано относительно высоким значением IC_{50}, составляющим приблизительно 4 нМ. Следовательно, антитело 25E7.G8 не отбирали для дальнейшей разработки.

(4) Антитела к NKG2A, которые продемонстрировали желаемое специфичное связывание с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками.

Как показано на фиг. 18A, 1×10^6 экспрессирующих человеческий NKG2A или экспрессирующих человеческий NKG2C CHO клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку PE вторичным козьим антителом к человеческому IgG в течение 30 минут при температуре 4°C для выявления связанного антитела на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 18B-C показана кривая связывания и EC_{50} (нМ) для связывания антител к NKG2A с экспрессирующими человеческий NKG2A или экспрессирующими человеческий NKG2C CHO клетками. Антитела 13F3.A4, 11H9.A1 и 2EB.B1 демонстрировали специфичное связывание с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками, что демонстрируется значениями EC_{50}, составляющими 0,7 нМ, 0,7 нМ и 0,3 нМ, соответственно.

Как показано на фиг. 21A, 1×10^6 экспрессирующих человеческий NKG2A и NKG2A яванского макака CHO клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела (10 мкг/мл) в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку PE вторичным козьим антителом к человеческому IgG в течение 30 минут при 4°C для выявления связанного антитела на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 21B-C показаны кривые связывания и значения EC_{50} для связывания антител к человеческому NKG2A с экспрессирующими человеческий NKG2A CHO клетками.

Как показано на фиг. 21B, все из антител NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14 и NKG2A.15 демонстрировали относительно низкие значения EC_{50} (0,1 нМ, 0,1 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ и 0,1 нМ, соответственно), что указывало на то, что антитела к NKG2A в соответствии с желаниями специфично связывались с рецептором NKG2A в экспрессирующих человеческий NKG2A CHO клетках. Аналогично, как показано на фиг. 21C, антитела NKG2A.5, 4G5.D1 и 1G5.B2 демонстрировали относительно низкие значения EC_{50} (0,3 нМ, 0,6 нМ и 0,6 нМ, соответственно), что указывало на то, что антитела связывались с рецептором NKG2A. Следовательно, на этой стадии NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5, 4G5.D1 и 1G5.B2 отбирали для дальнейшей разработки.

(5) Антитела к NKG2A, которые связывались с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками

Оценивали способность антител к NKG2A к связыванию с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками. Как показано на фиг. 22A, 1×10^6 экспрессирующих NKG2A яванского макака CHO клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A (10 мкг/мл) в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку пентамером HLA-E (Proimmune) для выявления связанного HLA-E на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 22B-C показаны кривые связывания и значения EC_{50} для связывания антител к человеческому NKG2A с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками.

Как показано на фиг. 22B, все из антител NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14 и NKG2A.15 демонстрировали относительно низкие значения EC_{50} (1,2 нМ, 1,3 нМ, 1,4 нМ, 1,2 нМ, 1,2 нМ и 1,5 нМ, соответственно), что указывало на то, что антитела к NKG2A связывались с рецептором NKG2A в экспрессирующих NKG2A яванского макака CHO клетках.

Как показано на фиг. 22C, антитела NKG2A.5, 4G5.D1 и 1G5.B2 демонстрировали слабое связывание с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками, что демонстрируется относительно высокими значениями EC_{50}, составляющими 172 нМ, приблизительно 314 нМ и 21 нМ, соответственно. Следовательно, эти три антитела не отбирали для дальнейшей разработки. Антитело 2G6.C2 имело значение EC_{50}, составляющее 0,6 нМ, что показывало соответствующее желаниям специфичное связывание с экспрессирующими NKG2A яванского макака CHO клетками; следовательно, антитело 2G6.C2 отбирали для дальнейшей разработки.

Способность антитела 2G6.C2 к специфичному связыванию с рецептором NKG2A и блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E оценивали с применением тех же способов, которые описаны выше в данном примере 3(3) и 3(4), и как изображено на фиг. 23A и 23C. Антитело 2G6.C2 являлось сравнимым, например, с антителом NKG2A.9 по своей способности к блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E, что демонстрируется подобными значениями IC_{50}, составляющими 1,1 нМ для антитела NKG2A.9 и 1,3 нМ для антитела 2G6.C2, как показано на фиг. 23B. Аналогично, антитело 2G6.C2 являлось сравнимым, например, с антителом NKG2A.9 по своей способности к связыванию с рецептором NKG2A в экспрессирующих человеческий NKG2A CHO клетках, что демонстрируется подобными значениями EC_{50}, составляющими 0,8 нМ для антитела NKG2A.9 и 1 нМ для антитела 2G6.C2, как показано на фиг. 23D.

Несмотря на способность к желаемому блокированию взаимодействия NKG2A/HLA-E и связыванию с рецептором NKG2A, антитело 2G6.C2 не отбирали для дальнейшей разработки вследствие неспецифически усиленной функциональности 2G6.C2 среди отрицательных по NKG2A (-) NK-клеток. Это демонстрирует сложность в обнаружении антител к NKG2A с желаемыми функциональными характеристиками, описанными в настоящем документе, для лечения рака.

(6) Антитела к NKG2A, которые связываются с NKG2A+ линией клеток-натуральных киллеров (NKL)

Как показано на фиг. 19A, 1×10^6 эндогенно экспрессирующих NKG2A человеческих NKL клеток инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку PE вторичным козьим антителом к человеческому IgG в течение 30 минут при температуре 4°C для выявления связанного антитела на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 19B представлена кривая связывания и значения EC_{50} (нМ) для связывания антител к NKG2A с экспрессирующими человеческий NKG2A NKL клетками. Значения EC_{50} для антител 13F3.A4, 11H9.A1, 4G5.D1 и IG5.B2 составляли 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ и 0,3 нМ, соответственно, и эти значения указывали на то, что эти антитела к NKG2A в соответствии с желаниями специфично связываются с NKG2A+ клетками-натуральными киллерами.

(7) Антитела к NKG2A, которые связываются с положительными по NKG2A(+) яванского макака NKL

Как показано на фиг. 24A, 1×10^6 мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных у яванских макаков, инкубировали с последовательно увеличивающимися количествами антитела к NKG2A в течение 30 минут при температуре 4°C. Клетки промывали и окрашивали несущим флуоресцентную метку PE вторичным козьим антителом к человеческому IgG в течение 30 минут при температуре 4°C для выявления связанного антитела на клеточной поверхности. Считывали флуоресценцию клеток в свежем состоянии на BD LSRFortessa. На фиг. 24B показана кривая связывания и значения EC_{50} (нМ) для связывания антител к NKG2A с экспрессирующими NKG2A яванского макака NK-клетками. Как показано на фиг. 24B, антитела 11H9.A1 и 4G5.D1 не связывались с положительными по NKG2A(+) яванского макака NK-клетками, на что указывали значения EC_{50}, составляющие 28 нМ и 38 нМ, соответственно. Следовательно, вследствие отсутствия их связывания с положительными по NKG2A(+) яванского макака NK-клетками антитела 11H9.A1 и 4G5.D1 исключали из дальнейшей разработки для лечения, например, рака. Антитело 13F3.A4 в соответствии с желаниями связывалось с

положительными по NKG2A(+) яванского макака NK-клетками, на что указывало значение EC_{50}, составляющее 0,2 нМ. Следовательно, антитело 13F3.A4 демонстрировало желаемую функциональность связывания, и его отбирали для дальнейшей модификации и разработки.

(8) Антитела к NKG2A, которые усиливали клеточный ответ, заключающийся в дегрануляции клеток-натуральных киллеров (NK)

В экспериментах *in vitro* с применением мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от здоровых людей-доноров блокада антителом к NKG2A взаимодействия NKG2A/HLA-E у активированных NK-клеток повышала дегрануляцию NK-клеток. Один из механизмов, посредством которых NK-клетки уничтожают свои мишени, такие как опухолевые клетки, как полагают, представляет собой сложный многостадийный процесс, который завершается направленной секрецией гранул, содержащих литические ферменты: перфорин и гранзимы. Этот клеточный процесс направленной секреции молекул из гранул известен как дегрануляция. После того как NK-клетки высвобождают секреторные литические гранулы, например, в опухолевые клетки-мишени, перфорин образует поры в мембранах опухолевых клеток-мишеней, а гранзимы затем достигают цитоплазмы опухолевой клетки-мишени и индуцируют гибель опухолевой клетки (также известную как апоптоз). В ходе этого процесса лизосома-ассоциированный мембранный белок 1 (LAMP-1, также известный как CD107A) транспортируется к поверхности NK-клетки, что делает ее доступной для связывания с антителом, тем самым обеспечивая возможность идентификации NK-клеток, которые проявили активность, заключающуюся в дегрануляции. Следовательно, авторы настоящего изобретения измерили воздействие антител к NKG2A, раскрытых в настоящем документе, на активацию NK-клеток и усиление функциональности NK-клеток в отношении процесса дегрануляции, что приводит в результате к повышенной гибели опухолевых клеток. Этот процесс частично проиллюстрирован на фиг. 25A. X в NK-клетке иллюстрирует ингибирующий сигнал, когда NKG2A взаимодействует с HLA-E. Темными кругами в NK-клетке показаны гранулы.

NK-клетки, выделенные из PBMC от нормальных доноров, активировали в течение ночи с использованием рекомбинантного человеческого (rh) интерлейкина 2 (IL-2). В частности, NK-клетки выделяли из цельной крови человека с применением градиента плотности фиколла и набора для выделения человеческих NK-клеток (Miltenyi Biotech). NK-клетки культивировали в течение ночи с rh IL-2 (400 IU/мл). После активации жизнеспособность клеток составляла более чем 90%, что определяли с помощью устройства для подсчета клеток. NK-клетки затем культивировали в течение четырех часов совместно с 5×10^4 клеток из линии человеческих B-лимфобластоидных клеток-мишеней 721.221, экспрессирующих HLA-E, в присутствии антител к человеческому NKG2A

(NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5, 2G6.C2, 4G5.D1, 25E7.G8) и антитела изотипического контроля (человеческого IgG1.3). Клетки затем собирали и окрашивали в отношении следующих маркеров: антитело к человеческому CD3, антитело к человеческому CD56, маркер, определяющий живые/мервые клетки, и антитело к человеческому CD107a, а также неконкурирующее антитело к человеческому NKG2A (клон 27H4.D4). Клетки исследовали в свежем состоянии на BD LSRFortessa™. Выраженную в процентах дегрануляцию (% CD107) у NKG2A+ или NKG2A- NK-клеток затем анализировали на FlowJo версии 10 (программное обеспечение для проточной цитометрии). Кратность повышения рассчитывали на основании повышения %CD107a по сравнению с изотипическим контролем.

В присутствии моноклональных антител к человеческому NKG2A существовало повышение дегрануляции NK-клеток, которое измеряли на основании экспрессии CD107a с помощью проточной цитометрии. Повышение ответа NK-клеток не наблюдалось на отрицательных по NKG2A(-) NK-клетках, что демонстрировало, что воздействие антитела являлось специфическим по отношению к экспрессирующим NKG2A NK-клеткам.

Фиг. 25B-C представляют собой графические изображения анализов методом проточной цитометрии и показывают, что все исследуемые антитела к NKG2A (антитела NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5, 2G6.C2 и 4G5.D1) усиливали дегрануляцию NK-клеток (которую измеряли на основании кратности изменения %CD107a по сравнению с изотипическим контролем) среди NKG2A+ NK-клеток, за исключением клона 25E7.G8 (не обеспечивающее блокирование антитело) (как показано на фиг. 25B), которое включали в качестве отрицательного контроля. (Иначе говоря, ожидали, что антитело 25E7.G8 не будет повышать дегрануляцию NK-клеток, поскольку антитело не блокирует путь NKG2A/HLA-E).

В частности, при оценке NK-клеток от нескольких доноров с использованием фиксированной концентрации 10 мкг/мл антитела NKG2A.9 присутствовало примерно двукратное повышение выраженной в процентах дегрануляции у экспрессирующих NKG2A+ NK-клеток по сравнению с изотипическим контролем в виде человеческого IgG1.3. Как показано на фиг. 25C, для антител NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5 и 4G5.D1 повышение ответа NK-клеток не наблюдали на отрицательных по NKG2A(-) (также называемых в настоящем документе NKG2A-) NK-клетках, что демонстрировало, что % повышение CD107 было специфическим по отношению к экспрессирующим NKG2A NK-клеткам. Иначе говоря, в случае нескольких из антител к NKG2A (антител NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5, 4G5.D1) усиленная дегрануляция у

положительных по NKG2A(+) (также называемых в настоящем документе NKG2A+) NK-клеток и отсутствие усиленной дегрануляции у отрицательных по NKG2A(-) NK-клеток демонстрировали, что для усиления функциональности была необходима экспрессия рецептора NKG2A. Одним исключением по отношению к этому результату, как показано на фиг. 25C, являлось антитело 2G6.C2, которое демонстрировало усиленную дегрануляцию NK-клеток даже у отрицательных по NKG2A(-) NK-клеток. Иначе говоря, усиленная дегрануляция при использовании антитела 2G6.C2 не являлась специфической для взаимодействия NKG2A/HLA-E. Следовательно, антитело 2G6.C2 не отбирали для дальнейшего изучения.

Подводя итог, следует отметить, что антитела NKG2A.9, NKG2A.10, NKG2A.11, NKG2A.12, NKG2A.14, NKG2A.15, NKG2A.5 и 4G5.D1 неожиданно и в соответствии с желаниями специфично усиливали дегрануляцию у экспрессирующих NKG2A NK-клеток по сравнению с изотипическим контролем. Как показано на фиг. 25B, в случае антитела NKG2A.9 эта усиленная дегрануляция была повышена примерно в два раза по сравнению с изотипическим контролем. Тем не менее, другие антитела к NKG2A не отбирали для дальнейшей разработки вследствие того, что они не демонстрировали желательные функциональные характеристики. Например, антитело 2G6.C2 давало в результате повышенную функциональность в отрицательных в отношении экспрессии NKG2A(-) клетках, что говорит о том, что антитело 2G6.C2 не оказывало непосредственное влияние на взаимодействие NKG2A/HLA-E. Антитело P1-069366 также не демонстрировало функциональность в анализе дегрануляции NK-клеток. Как показано на фиг. 53, антитело P10069366 имело подобный % $CD107^+$ среди $NKG2A^+$ NK-клеток, что и изотипический контроль. Следовательно, антитела 2G6.C2 и P1-069366 не отбирали для дальнейшей разработки, поскольку они не усиливали дегрануляцию в NK-клетках.

(9) Антитела к NKG2A, которые усиливали ответ NK-клеток, заключающийся в повышенном продуцировании интерферона-гамма (IFNγ).

Антитела к человеческому NKG2A повышали продуцирование IFN-γ в NKL клетках, культивируемых совместно с CHO/MICA/HLA-E (CHO клетки, подвергнутые воздействию методов генной инженерии с целью экспрессии HLA-E и MICA, лиганда для активирующего NK-клетки рецептора NKG2D). Как иллюстрируется на фиг. 26A, в экспериментах *in vitro* с применением NKL клеток и CHO/MICA/HLA-E блокада антителом к NKG2A взаимодействия NKG2A/HLA-E у активированных NK-клеток (посредством пути MICA-NKG2D) в соответствии с желаниями повышала продуцирование IFN-γ. Авторы настоящего изобретения вначале активировали NKL клетки с применением трансфицированного MICA на CHO клетках, благодаря чему активированные NKL клетки

могут уничтожать клетки мишени - CHO/MICA/HLA-E клетки. MICA функционирует в качестве лиганда, распознаваемого активирующим рецептором NKG2D, который экспрессируется на поверхности NK-клеток. Антитела оценивали в анализе с применением совместной культуры NKL и CHO/MICA/HLA-E клеток. В этом анализе MICA на CHO клетках служил для активации NKL клеток посредством NKG2A (положительный сигнал), и экспрессия HLA-E на CHO клетках ингибирует экспрессирующие NKG2A NKL клетки (отрицательный сигнал). В анализе исследовали, будет ли антитело к NKG2A блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E и в соответствии с желаниями повышать продуцирование IFN-γ.

В частности, NKL клетки культивировали совместно с CHO/MICA/HLA-E при соотношении эффекторная клетка:клетка мишень (E:T), составляющем 4:1, в присутствии 10 мкг/мл антитела к человеческому NKG2A или антитела изотипического контроля. После стимуляции в течение ночи в инкубаторе при температуре 37°C продуцирование IFN-γ измеряли в супернатанте с помощью ELISA. Как показано на фиг. 26B, антитела 13F3.A4, 11H9.A1 и 4G5.D1 в соответствии с желаниями повышали продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем (человеческий IgG1.3). Антитело 25E7.G8 - антитело к человеческому NKG2A, которое не блокирует взаимодействие NKG2A/HLA-E, применяли в качестве отрицательного контроля, и, как ожидалось, оно не повышало продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем.

(10) Антитела к NKG2A, которые усиливали ответ CD8+ Т-клеток, заключающийся в повышенном продуцировании IFNγ.

Антитела к человеческому NKG2A повышали продуцирование IFN-γ у CD8+ Т-клеток, культивируемых совместно с линией клеток карциномы поджелудочной железы, Hs766T.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от нормальных доноров активировали в течение трех суток с использованием связанного с планшетом CD3 (OKT3) и rhIL-15 для повышения экспрессии NKG2A у CD8+ Т-клеток. Как показано на фиг. 27A, CD8+ Т-клетки культивировали совместно с клетками-мишенями Hs766T (обработанными митомицином C) при соотношении эффекторная клетка:клетка мишень (E:T), составляющем 1:1, в присутствии 10 мкг/мл антител к человеческому NKG2A или антитела изотипического контроля (человеческий IgG1.3). Спустя пять суток стимуляции при температуре 37°C продуцирование IFN-γ измеряли в супернатанте с помощью ELISA.

Как показано на фиг. 27B, антитела 13F3.A4 и 11H9.A1 повышали продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем. Антитело 25E7.G8 - антитело к человеческому NKG2A, которое не блокирует взаимодействие NKG2A/HLA-E, применяли

в качестве отрицательного контроля, и, как ожидалось, оно не повышало продуцирование IFN-γ по сравнению с изотипическим контролем. В частности, HS766T представляет собой линию клеток карциномы поджелудочной железы, которые эндогенно экспрессируют HLA-E. CD8+ Т-клетки из PBMC от здоровых доноров обычно экспрессируют низкие уровни NKG2A. Тем не менее, при использовании стимуляции антителом к CD3 и IL-15 авторы настоящего изобретения были способны повысить экспрессию NKG2A на этих клетках. В этой системе CD8+ Т-клетки экспрессируют NKG2A, а клетки-мишени HS766T экспрессируют HLA-E. Антитела 13F3.A4 и 11H9.A1 блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E и повышали цитотоксическую функциональность CD8+ Т-клеток, что демонстрировалось повышением продуцирования IFN-γ.

(11) Антитело 13F3.A4 и варианты, в том числе антитело NKG2A.9, демонстрировали безопасные уровни нежелательной агрегации антител

Агрегаты антител представляют собой кластеры денатурированных молекул антител, которые необратимо образуются в ходе экспрессии антитела в клеточной культуре, очистки продукта или хранения антитела в виде лекарственного препарата. Процесс агрегации осложняется биохимическими и биофизическими свойствами антитела, которые оказывают на него влияние, а также физико-химической средой, воздействию которой антитело подвергается в ходе обработки и хранения. Агрегация антитела может открывать воздействию эпитопы, которые в норме не являются открытыми, что приводит к повышению иммуногенности. Процессы очистки для продуктов на основе антител направлены на достижение низких уровней агрегатов, например, менее чем 2% растворимых агрегатов. Исследования стабильности в условиях ускоренной деградации (также известные как исследования в условиях форсированной деградации) проводили на восьми вариантах антитела 13F3.A4 (NKG2A.9, NKG2A.13, NKG2A.18, NKG2A.19, NKG2A.21, NKG2A.22, NKG2A.23 и NKG2A.24), чтобы выяснить склонность к агрегации у этих антител в условиях хранения при температуре 4°C и 25°C в течение одного месяца. Стабильность NKG2A.20 исследовали только при температуре 4°C вследствие ограниченной доступности материала. Состав с 20 мМ гистидином (pH 6,0), 260 мМ сахарозой, 50 мкМ DTPA и 0,05% полисорбатом 80 применяли в качестве состава для исследования в случае всех антител. Растворимые агрегаты отслеживали с помощью анализа методом гель-хроматографии (SEC). Исследуемые концентрации основывались на доступности материала. SEC выявляла сравнимые склонности к агрегации для всех антител за исключением NKG2A.19, для которого наблюдали несколько пиков. Несмотря на то что оно не связывалось посредством любого другого механизма, NKG2A.19 могло

подвергнуться распаду вследствие присутствия существенных уровней протеазы в партии исследуемого материала.

В целом, уровни агрегации (менее 2% растворимых агрегатов при температуре 25°C спустя один месяц хранения) указывали на целесообразность получения состава при pH 6,0 для других исследуемых антител. Данные физической стабильности демонстрировали менее 2% растворимых агрегатов спустя один месяц хранения при температуре 25°C, что указывало на то, что исследуемый состав с антителами к NKG2A являлся подходящим в качестве предварительного состава, обеспечивая приемлемую стабильность при хранении для лекарственной субстанции в исследуемой концентрации.

		Растворимый агрегат (%)	
Последовательность NKG2A	**Исследуемая концентрация (мг/мл)**	**4°C в течение одного месяца**	**25°C в течение одного месяца**
NKG2A.9	150	0,7	0,8
NKG2A.18	90	не выявлено	1,2
NKG2A.19	54	распавшийся образец	
NKG2A.20	6	1,2	не исследовалось
NKG2A.21	43	1,3	1,9
NKG2A.22	120	0,8	1,2
NKG2A.23	130	0,8	1,1
NKG2A.24	120	0,8	1,1

(12) Антитело NKG2A.9 связывалось с высокой аффинностью с белком NKG2A в сравнении с NKG2C

Специфичность антитела NKG2A.9 в отношении белка NKG2A по сравнению с белком NKG2C оценивали посредством определения кинетических параметров и аффинностей с применением SPR инструмента Biacore T200. Каждый из внеклеточных доменов белка NKG2A и белка NKG2C получали в виде гетеродимера с внеклеточным доменом CD94. Температура при анализе составляла 37°C, и подвижный буфер представлял собой солевой буферный раствор HEPES (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl) с pH 7,4, дополненный 0,05% Tween-20 и 1 г/л бычьего сывороточного альбумина (BSA). Антитело NKG2A.9 захватывали на сенсорном чипе CM4 с предварительно иммобилизированным реактивом для захвата в виде антитела к человеческому Fc фрагменту (Southern Biotech, номер в каталоге 2081-01). Каждый из гетеродимеров NKG2A-CD94 и NKG2C-CD94 пропускали в качестве анализируемых веществ над захваченным антителом в двух сериях трехкратных разведений из пяти этапов. Одну серию концентраций использовали для измерения кинетических параметров за один цикл, а другую - для кинетических параметров

за несколько циклов. Для анализа кинетических параметров за несколько циклов вторую наивысшую концентрацию впрыскивали в двух повторностях. Наивысшая концентрация для NKG2A-CD94 составляла 250 нМ, и наивысшая концентрация для NKG2C-CD94 составляла 1,5 мкМ. Все данные сравнивали с двумя эталонами и аппроксимировали к модели связывания 1:1 с переносом массы с применением программного обеспечения для оценки данных Biacore T200 версии 3.1

Обычно, как обсуждается в настоящем документе, два кинетических параметра определяют аффинность связывания. Первый параметр отражает то, как быстро образуется комплекс (скорость ассоциации, k_a), а второй параметр отражает то, как быстро комплекс диссоциирует или распадается (скорость диссоциации, k_d). Оба кинетических параметра можно свести в равновесной константе диссоциации (K_D), которая определена как k_d/k_a. Этот сравнительный эксперимент Biacore направлен на оба параметра взаимодействия: как быстро образовывался (k_a) комплекс антитело NKG2A.9/белок NKG2, и как быстро он распадался (k_d).

В этом сравнительном эксперименте Biacore антитело NKG2A.9 продемонстрировало в 15 раз более сильное связывание с белком NKG2A, чем с белком NKG2C (K_D $3,9\times10^{-8}$ М для связывания с NKG2A в сравнении с K_D $5,7\times10^{-7}$ М для связывания с NKG2C). Иначе говоря, антитело NKG2A.9 демонстрировало в 15 раз более слабое связывание с белком NKG2C, чем с белком NKG2A. Эти результаты указывают на то, что антитело NKG2A.9 характеризовалось высокой селективностью в отношении белка NKG2A по сравнению с белком NKG2C, что кратко изложено в таблице ниже. Более сильное связывание антитела NKG2A.9 с белком NKG2A было обусловлено большей скоростью ассоциации (ka), то есть тем, как быстро образовывался комплекс антитело NKG2A.9/белок NKG2A по сравнению с комплексом антитело NKG2A.9/белок NKG2C. Иначе говоря, антитело NKG2A.9 образовывало комплекс с белком NKG2A в 15 раз быстрее, чем с белком NKG2C.

Таблица. Сравнительные аффинности антитела NKG2A.9 в отношении белков NKG2A и NKG2C

Лиганд	Образец	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (М)	Соотношение K_D (NKG2C/NKG2A)
NKG2A.9	hNKG2A-гетеродимер	$3,9\times10^{5}$	$1,5\times10^{-2}$	$3,9\times10^{-8}$	
NKG2A.9	hNKG2C-гетеродимер	$2,4\times10^{4}$	$1,4\times10^{-2}$	$5,7\times10^{-7}$	15

На фиг. 56A-D представлена аффинность связывания антитела NKG2A.9 с гетеродимерами человеческого NKG2A-CD94 (фиг. 56A-B) и гетеродимерами NKG2C-CD94 (фиг. 56C-D) при температуре 37°C, которая определена с помощью метода Biacore при использовании определения кинетических параметров за один цикл (фиг. 56A и 56C) и определения кинетических параметров за несколько циклов (фиг. 56B и 56D). Ответ в виде SPR представлен для ассоциации и диссоциации анализируемого вещества.

В соответствии с другими вариантами осуществления антитело NKG2A.9 образует комплекс с белком NKG2A в 14 раз быстрее, в 13 раз быстрее, в 12 раз быстрее, в 11 раз быстрее, в 10 раз быстрее, в 9 раз быстрее, в 8 раз быстрее, в 7 раз быстрее, в 6 раз быстрее, в 5 раз быстрее, в 4 раза быстрее, в три раза быстрее или в два раза быстрее, чем с белком NKG2C.

(13) Краткое описание неожиданных и желаемых функциональных свойств антител к NKG2A

Кратко, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили определенные антитела к NKG2A, которые проявляли различные функциональные свойства для лечения, например, рака. В соответствии с определенными вариантами осуществления эти антитела к NKG2A включают в себя клон антитела 13F3.A4 и варианты, включающие в себя антитела NKG2A.9 и NKG2A.11, которые идентифицировали и отбирали из сотен антител, которые не проявляли желаемые функциональные свойства. В частности, антитело NKG2A.9 представляет собой антитело к hNKG2A, которое также известно как 13F3.A4-VH-I107T-N30S IgG1.3 и будет называться в настоящем документе антителом «NKG2A.9». Мутации по остатку VH-107T (мутация в каркасном участке, возвращающая фенотип к эмбриональному типу) и по остатку VK-N30S для снижения потенциала дезамидирования и снижения риска иммуногенности приводили в результате к обнаружению антитела NKG2A.9. Как описано в настоящем документе и показано на фиг. 13, оценивали различные недостатки последовательности у антитела 13F3.A4, что привело к оптимизации и разработке, например, антитела NKG2A.9.

Как более подробно описано в примерах в настоящем документе, антитела к NKG2A, в том числе антитело NKG2A.9, демонстрировали, например, следующие неожиданные и желаемые функциональные характеристики:

a) блокировали взаимодействие NKG2A/HLA-E;

b) обращали опосредованную NKG2A передачу ингибирующего сигнала;

c) не связывались или связывались с низкой аффинностью с клетками, экспрессирующими белок человеческого NKG2C;

d) связывались с высокой аффинностью с клетками, экспрессирующими

человеческий NKG2A и NKG2A яванского макака; и/или

e) связывались с NKG2A+ клетками-натуральными киллерами человека и яванского макака

f) усиливали ответ клеток-натуральных киллеров, например, заключающийся в повышенном продуцировании интерферона-гамма (IFNγ); и/или

g) усиливали ответ CD8+ Т-клеток, например, заключающийся в повышенном продуцировании IFNγ; и/или

h) образовывали комплекс с белком NKG2A быстрее, чем с белком NKG2C; в соответствии с некоторыми вариантами осуществления образовывали комплекс с белком NKG2A в 15 раз быстрее, чем с белком NKG2C.

Антитело NKG2A.9 характеризовали и исследовали отдельно и в комбинации с дополнительными антителами, как описано в примерах в настоящем документе. Антитело NKG2A.9 связывалось с высокой аффинностью и специфичностью с белком человеческого NKG2A. Значения EC_{50} для связывания NKG2A.9 с белком NKG2A являлись такими, как указано ниже, и демонстрировали связывание NKG2A.9 с белком NKG2A:

Клеточные линии	EC_{50}
NKL (человеческий NKG2A эндогенно экспрессировался на линии NK-клеток)	0,4 нМ
CHO-человеческий NKG2A (человеческий NKG2A эктопически экспрессировался на CHO клетках)	0,6 нМ
CHO-NKG2A яванского макака (NKG2A яванского макака эктопически экспрессировался на CHO клетках)	1,2 нМ

Значения EC_{50} для связывания NKG2A.9 с белком NKG2C являлись такими, как указано ниже, и в соответствии с желаниями демонстрировали отсутствие связывания NKG2A.9 с белком человеческого NKG2C:

Клеточные линии	EC_{50}
CHO-человеческий NKG2C (человеческий NKG2C эктопически экспрессировался на CHO клетках)	9,0 нМ
CHO-NKG2C яванского макака (NKG2C яванского макака эктопически экспрессировался на CHO клетках)	0,8 нМ

Значения IC_{50} для NKG2A.9, которые демонстрировали блокирование взаимодействия NKG2A/HLA-E в клеточных анализах блокирования, являлись такими, как указано ниже:

Клеточные линии	IC_{50}
NKL	0,3 нМ
CHO-человеческий NKG2A	1,0 нМ

Значения EC_{50} демонстрировали, что антитело NKG2A.9 блокировало взаимодействие NKG2A/HLA-E. Значение EC_{50} для антитела NKG2A.9 демонстрировало, что связывание с белком человеческого NKG2A являлось в 15 раз меньшим, чем с белком человеческого NKG2C (0,6 нМ для NKG2A в сравнении с 9,0 нМ для NKG2C). Более того, в экспериментах SPR не наблюдали специфичное связывание антитела NKG2A.9 с человеческим NKG2C. Напротив, значения EC_{50} для связывания антитела NKG2A.9 с белками NKG2A яванского макака и NKG2C яванского макака являлись подобными (1,2 нМ для NKG2A в сравнении с 0,8 нМ для NKG2C). Антитело NKG2A.9 не блокировало взаимодействие человеческого NKG2C/HLA-E, что оценивали с помощью проточной цитометрии в условиях, обсуждаемых в настоящем документе. Отсутствие связывания с мышиным или крысиным NKG2A наблюдали с помощью проточной цитометрии на первичных NK-клетках.

Авторы настоящего изобретения применяли анализ по Скэтчарду для измерения аффинностей связывания у NKG2A.9. В случае NKG2A.9 анализ насыщения связывания с клетками и анализ по Скэтчарду на CHO-hNKG2A и CHO-NKG2A яванского макака установили конкретные аффинности связывания (значения K_D), составляющие приблизительно 0,4 нМ и 1,0 нМ, соответственно, как показано на фиг. 52A-B. В частности, NKG2A.9 метили радиоактивным йодом ^{125}I-Na (1 мКи; PerkinElmer, номер в каталоге NEZ033H001 MC) с использованием реактива для твердофазного йодирования IODO-GEN® (1,3,4,6-тетрахлор-3a-6a-дифенилгликоурил; Pierce, номер в каталоге 28601). Избыток йода удаляли с применением колонки для обессоливания (Pierce, номер в каталоге 43243). Фракции меченного антитела собирали и анализировали в отношении радиоактивности на счетчике гамма-частиц Wizard 1470. Концентрацию ^{125}I-NKG2A.9 в каждой фракции рассчитывали с использованием флуориметра Qubit от Invitrogen. Частоту включения радиоактивной метки устанавливали с помощью тонкослойной хроматографии белка, соответствующего пику, и радиоактивных фракций. Связывание меченого радиоактивным йодом NKG2A.9 со сверхэкспрессирующими человеческий NKG2A или

NKG2A яванского макака CHO клетками демонстрировали посредством инкубирования CHO клеток, экспрессирующих человеческий NKG2A или NKG2A яванского, с титрованием 125I-NKG2A.9. Неспецифичное связывание определяли по связыванию в присутствии титрования 100-кратным молярным избытком немеченного антитела и вычитали из суммарного значения CPM для расчета специфичного связывания. Линейную стандартную кривую зависимости CPM от концентрации 125I-NKG2A.9 применяли для экстраполяции специфичной активности, максимального количества нМ связанного 125I-NKG2A.9 и, следовательно, расчета количества рецепторов на клетку. Результаты анализа по Скэтчарду демонстрировали, что NKG2A.9 специфично связывалось с CHO-hNKG2A с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей 0,4 нМ, и с трансфектантами CHO-NKG2A яванского макака с K_D, составляющей 0,1 нМ. Относительную аффинность связывания NKG2A.9 с NKG2A яванского макака определяли с помощью SPR, пропуская Fab NKG2A.9 над чипом CM4 с иммобилизированным NKG2A-CD94-mFc обезьяны (усеченная конструкция для достижения экспрессии). Человеческий NKG2A-CD94-mFc, связанный со второй проточной кюветой, служил в качестве контроля. Еще одну проточную кювету оставляли пустой для вычитания из эталонного значения. Измерение проводили на инструменте Biacore T200 при температуре 37°C с применением солевого буферного раствора Hepes (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl) с pH 7,4, дополненного 0,05% Tween-20 и 1 г/л BSA, в качестве подвижного буфера. Серию концентраций Fab NKG2A.9 впрыскивали на различные проточные кюветы. Все данные сравнивали с двумя эталонами и аппроксимировали к ленгмюровской модели 1:1 с применением программного обеспечения для оценки данных Biacore T200 версии 3.1. В этом анализе моновалентное связывание Fab NKG2A.9 с человеческим NKG2A являлось примерно в 26 раз более сильным, чем связывание с NKG2A яванского макака. Значение K_D, которое измеряли с помощью SPR, для человеческого NKG2A составляло 61 нМ, и K_D значение, которое измеряли с помощью SPR, для NKG2A яванского макака составляло 1600 нМ, как показано в таблице ниже. Эти значения K_D указывали на то, что Fab NKG2A.9 связывается с рекомбинантным NKG2A яванского макака, но более высокие концентрации Fab нужно использовать для достижения уровня связывания (уровня насыщения), подобного таковому у человеческого NKG2A.

	hNKG2A-CD94			cyNKG2A-CD94	Соотношение K_D (циклы/час)
Анализируемое вещество	k_a (1/M c)	k_d (1/c)	K_D (нМ)	K_D (нМ)	
Fab NKG2A.9	$3,4\times10_5$	$2,0\times10^{-2}$	61 нМ	1600 нМ	приблизительно 26

Пример 4. Картирование эпитопов для антител к NKG2A

Известные в уровне техники способы применяли для зондирования участков NKG2A, с которыми связываются антитела к NKG2A, в частности, антитела 13F3.A4 и NKG2A.9. Масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP) применяли для зондирования связывающих эпитопов hNKG2A с использованием антител 13F3.A4 и NKG2A.9.

Эксперименты HDX-MS на mFc-hNKG2A-hCD94/NKG2A.9 обеспечивали 95% охват последовательности для mFc-NKG2A-CD94. Измерения FPOP давали на выходе 99% охват последовательности на NKG2A. Суммарный охват последовательности для NKG2A составлял 100% при использовании объединенного набора данных HDX-MS и FPOP. Аналогично, эксперименты HDX-MS на mFc-hNKG2A-hCD94/13F3 обеспечивали 95% охват последовательности для mFc-NKG2A-CD94. Измерения FPOP давали на выходе 99% охват последовательности на NKG2A. Суммарный охват последовательности для NKG2A составлял 100% при использовании объединенного набора данных HDX-MS и FPOP.

Как обсуждалось более подробно в этом примере, определенные варианты настоящего изобретения относятся к моноклональному антителу к NKG2A или его антигенсвязывающей части, которые специфично связываются с эпитопом, расположенным в прерывающихся участках, охватывающих примерно следующие аминокислотные остатки, которые определены с помощью картирования эпитопов методами HDX-MS и/или FPOP:

Участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 в SEQ ID NO: 2 (нативная аминокислотная последовательность hNKG2A);

Участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 в SEQ ID NO: 2);

Участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 в SEQ ID NO: 2);

Участок 4: L (аминокислотный остаток 206 в SEQ ID NO: 2); и

Участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 в SEQ ID NO: 2).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение направлено на моноклональное антитело к NKG2A или его антигенсвязывающую часть, которые специфично связываются с эпитопом, расположенным в прерывающихся участках, состоящих из следующих аминокислотных остатков, которые определены с помощью HDX-MS:

Участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 в SEQ ID NO: 2);

Участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 в SEQ ID NO: 2);

Участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 в SEQ ID NO: 2); и

Участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 в SEQ ID NO: 2).

Подготовка к экспериментам по картированию эпитопов.

Перед экспериментами по картированию эпитопов эксперименты с недейтерированными молекулами проводили для получения перечня общих пептидов для рекомбинантного mFc-hNKG2A-hCD94 и белковых комплексов mFc-NKG2A-CD94 и исходного Fab 13F3 или Fab NKG2A.9 (15 мкМ, молярное отношение 1:1). В экспериментах HDX-MS 5 мкл каждого образца (mFc-hNKG2A-hCD94 или mFc-hNKG2A-hCD94 с Fab) разводили в 55 мкл буфера с оксидом дейтерия (D_2O) (10 мМ фосфатный буфер, D_2O, pD 7,0) для начала реакций мечения. Реакции проводили в течение различных периодов времени: 20 секунд, 1 минута, 10 минут и 4 часа. По окончании периода каждой реакции мечения реакцию гасили посредством добавления гасящего буфера (100 мМ фосфатный буфер с 4 М гидрохлоридом гуанидина (GdnCl) и 0,4 М трис(2-карбоксилэтил)фосфином (TCEP), pH 2,5, 1:1, объем/объем) и 50 мкл гашеного образца впрыскивали в систему Waters HDX-MS для анализа. Уровни поглощения дейтерия для пептидов, обычно получаемых в результате расщепления, отслеживали в отсутствие или в присутствии Fab.

Картирование эпитопов 13F3 и NKG2A.9 с помощью HDX-MS.

HDX-MS. HDX-MS зондирует конформацию белка и динамику изменения конформации в растворе посредством мониторинга скорости и степени дейтериевого обмена в атомах водорода амидной группы в остове (R. Huang and G. Chen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 6541-58 (2014); Wei *et al.*, *Drug Discovery Today*, 19: 95-102 (2014). Уровень HDX зависит от доступности для растворителя атомов водорода амидной

группы в остове, а также водородных связей в белке. Повышение массы белка при HDX можно точно измерить с помощью MS. Когда эту методику применяют в паре с ферментативным расщеплением, можно выяснить структурные особенности на уровне пептида, что позволяет отделять обращенные к поверхности пептиды от пептидов, повернутых внутрь. Как правило, проводят эксперименты с мечением дейтерием и последующим гашением, за которым следует ферментативное расщепление, разделение пептидов и MS-анализ.

На фиг. 28A показан дифференциальный HDX для mFc-hNKG2A-hCD94 при взаимодействии с антителом NKG2A.9. На фиг. 28B показан дифференциальный HDX для mFc-NKG2A-CD94 при взаимодействии с 13F3.A4. Данные на фиг. 28A-B демонстрируют, что эпитопы являются одинаковыми для антител NGK2A.9 и 13F.3.A4, в частности, анализ данных HDX-MS для антитела NKG2A9 в mFc-NKG2A-CD94 указывал на то, что NKG2A9 и исходное моноклональное антитело 13F3.A4 делят один и тот же эпитоп, который представляет собой следующие четыре прерывающихся участка в hNKG2A (номера остатков соответствуют нативной последовательности hNKG2A):

Участок 1: ^{155}LSIDNEEEMKF^{165} (аминокислотные остатки 155-165 в SEQ ID NO: 2);

Участок 2: ^{171}PSSWIGVFRNSSHHPW^{186} (аминокислотные остатки 171-186 в SEQ ID NO: 2);

Участок 3: ^{192}LAFKHEIKDSDN^{203} (аминокислотные остатки 192-203 в SEQ ID NO: 2); и

Участок 5: ^{212}QVNRLKSAQCGSSIIYHC^{229} (аминокислотные остатки 212-229 в SEQ ID NO: 2).

Эпитопы, картируемые в последовательности и кристаллической структуре mFc-hNKG2A-hCD94.

FPOP. Быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP) представляет собой методику футпринтинга белков для определения информации о структуре посредством картирования окисления, индуцируемого гидроксильными (OH) радикалами. (Li *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2017, 89, 2250-2258). Степень индуцируемого гидроксильным радикалом окисления напрямую зависит от доступности для растворителя боковых цепей аминокислот и химических свойств открытых растворителю аминокислот. Гидроксильные радикалы, образующиеся из перекиси водорода (H_2O_2) при активации лазером, имеют высокую реакционную способность и приводят к необратимым ковалентным модификациям в боковых цепях, не вызывая расщеплений остовов. FPOP в сочетании с ферментативным расщеплением и MS-анализом позволяет оценивать на уровне пептидов изменения в доступностях боковых цепей для растворителя вследствие белок-белковых

взаимодействий. Информацию на уровне остатков можно получить с помощью фрагментации в газовой фазе выбранных пептидных участков с помощью MS/MS. Эта методика обеспечивает дополнительную информацию к HDX.

Картирование эпитопов с помощью FPOP осуществляли на mFc-NKG2A-CD94 и mFc-NKG2A-CD94 в комплексе с исходным Fab 13F3 (15 мкМ, молярное отношение 1:1). Аналогично, картирование эпитопов с помощью FPOP осуществляли на mFc-NKG2A-CD94 и mFc-NKG2A-CD94 в комплексе с Fab NKG2A.9 (15 мкМ, молярное отношение 1:1).

В случае картирования эпитопов для обоих из антител 13F3.A4 и NKG2A.9 эксимерный лазер на основе фторида криптона (KrF) применяли для образования гидроксильных радикалов посредством фотолиза H_2O_2 и значение длины волны возбуждения устанавливали на 248 нм во избежание любого индуцируемого лазером изменения конформации белка. Непосредственно перед мечением 5 мкл гистидина и 5 мкл H_2O_2 добавляли к аликвоте белка. Конечный объем раствора белка составлял 50 мкл, и конечная концентрация гистидина составляла 500 мкМ, а H_2O_2 - 15 мМ. Образец затем впрыскивали в трубку с плавленым кварцем с прозрачным для ультрафиолетового излучения (UV) окном. Энергию лазера доводили до 70 мДж/импульс с частотой 7,4 Гц. Как эксперименты с FPOP, так и контрольные эксперименты без воздействия лазера осуществляли в трех параллелях. Каждую параллель собирали в микроцентрифужной пробирке, содержащей 11 мкл гасящего раствора (50 нМ каталазы и 20 мМ метионина). Образцы денатурировали, восстанавливали, алкилировали, дегликозилировали и расщепляли трипсином с последующим анализом методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC)/MS. Уровни окисления для пептидов, получаемых в результате расщепления, отслеживали в отсутствие или в присутствии Fab NKG2A.9.

В экспериментах FPOP четыре остатка, M163, F179, H184 и L206, в hNKG2A демонстрировали значительное снижение (P-значение <0,025) уровней окисления при связывании с исходным Fab 13F3. Аналогично, в экспериментах FPOP четыре остатка, M163, F179, H184 и L206, в hNKG2A демонстрировали значительное снижение (P-значение <0,025) уровней окисления при связывании с NKG2A9.

Для обоих из антител 13F3.A4 и NKG2A.9 полученное в результате FPOP процентное значение защиты при связывании с Fab рассчитывали следующим образом:

$$\frac{\left(\begin{matrix}\text{Относительное \% различие} \\ \text{FPOP у hNKG2A}\end{matrix}\right) - (\text{Относительное \% различие FPOP у комплекса hNKG2A/Fab})}{\text{Относительное \% различие FPOP у hNKG2A}} X\ 100$$

На фиг. 29A представлены процентные значения защиты для четырех остатков (M163, F179, H184, L206) в hNKG2A при взаимодействии с NKG2A.9. На фиг. 29B

представлены полученные с помощью FPOP процентные значения защиты для четырех остатков (M163, F179, H184, L206) в hNKG2A при взаимодействии с 13F3.A4.

Эпитопы, картируемые в последовательности и кристаллической структуре mFc-NKG2A-CD94.

Как показано на фиг. 30, эпитопы для антител NKG2A.9 и 13F3.A4, определенные с помощью HDX-MS и FPOP, картировали в последовательности mFc-hNKG2A-hCD94. В последовательности mFc-hNKG2A-hCD94 mFc представляет собой мышиный Fc участок, который связан через линкерную последовательность ASIEGR (SEQ ID NO: 123) (показана рамкой из пунктирной линии) с внеклеточным доменом hNKG2A, который связан через линкерную последовательность GGSGGS (SEQ ID NO: 124) (показана рамкой из пунктирной линии) с hCD94, который представляет собой человеческий белок CD94.

Как показано на фиг. 31, эпитоп для антитела к NKG2A (например, эпитопы для антител NKG2A.9 и 13F3.A4) можно визуализировать на кристаллической структуре NKG2A/CD94/HLA-E. В частности, на фиг. 31 изображен эпитоп для антитела к NKG2A (показан черным цветом) на кристаллической структуре NKG2A/CD94/HLA-E (кристаллическая структура человеческого CD94/NKG2A в комплексе с HLA-E опубликована Petrie *et al.*, *J. Exp. Med.* 205: 725-35 (2008), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кристаллическая структура HLA-E обозначена овалом, выполненным сплошной линией, и кристаллическая структура CD94 обозначена овалом, выполненным пунктирной линией.

Подводя итог, исходя из экспериментов HDX-MS и FPOP, обсуждаемых в настоящем документе, эпитоп NKG2A, с которым связываются антитела NKG2A.9 и 13F3.A4, включает в себя следующие прерывающиеся участки связывания:

Участок 1: LSIDNEEEMKF (аминокислотные остатки 155-165 в SEQ ID NO: 2);

Участок 2: PSSWIGVFRNSSHHPW (аминокислотные остатки 171-186 в SEQ ID NO: 2);

Участок 3: LAFKHEIKDSDN (аминокислотные остатки 192-203 в SEQ ID NO: 2);

Участок 4: L (аминокислотный остаток 206 в SEQ ID NO: 2); и

Участок 5: QVNRLKSAQCGSSIIYHC (аминокислотные остатки 212-229 в SEQ ID NO: 2).

В других экспериментах на основании экспериментов HDX-MS, обсуждаемых в настоящем документе, эпитоп NKG2A, с которым связываются антитела NKG2A.9 и 13F3.A4, включает в себя следующие прерывающиеся участки связывания:

Участок 1: LSIDNEEEMKF (аминокислотные остатки 155-165 в SEQ ID NO: 2);

Участок 2: PSSWIGVFRNSSHHPW (аминокислотные остатки 171-186 в SEQ ID NO: 2);

Участок 3: LAFKHEIKDSDN (аминокислотные остатки 192-203 в SEQ ID NO: 2); и

Участок 5: QVNRLKSAQCGSSIIYHC (аминокислотные остатки 212-229 в SEQ ID NO: 2).

Пример 5. Эксперименты по группированию эпитопов

(1) Антитело P1-069366 перекрестно блокировало 13F3.A4

Эксперимент по группированию эпитопов для P1-069366 и 13F3.A4 осуществляли с помощью SPR при использовании «сэндвич-формата», при котором антитело 1 иммобилизируют на чип Biacore T100 CM5, рекомбинантный белок человеческого NKG2A-CD94 пропускают над чипом Biacore T100 CM5 и обеспечивают возможность связывания, а затем антитело 2 пропускают над чипом. В частности, антитела 13F3.A4 или P1- иммобилизировали на сенсорном чипе CM5 посредством связывания через аминную группу. Раствор рекомбинантного белка NKG2A пропускали над сенсорным чипом, где, как наблюдали, он связывался с обоими антителами P1-069366 и 13F3.A4. Раствор конкурирующего антитела затем пропускали над чипом и измеряли дополнительное связывание (показатель совместного связывания с NKG2A). Наконец, сенсорный чип регенерировали с применением раствора $MgCl_2$, который удалял связавшийся NKG2A и конкурирующее антитело. Эксперимент проводили при температуре 25°C. Для анализа неспецифичное связывание в сравнительной проточной кювете вычитали из связывания в проточных кюветах с анализируемым образцом. Антитело P1-069366 непосредственно иммобилизировали в проточной кювете 2. Затем 200 нМ NKG2A пропускали через проточную кювету 2 и наблюдали связывание примерно 600 RU (резонансные единицы). Последующее впрыскивание антитела 13F3.A4, антитела P1-069366 или буфера (HBS-P) не приводило в результате к повышенному сигналу связывания. Антитело 13F3.A4 иммобилизировали на проточной кювете 3. Затем 200 нМ NKG2A пропускали через проточную кювету 3 и наблюдали связывание примерно 900 RU. Последующее впрыскивание антитела P1-069366, антитела 13F3.A4 или буфера (HBS-P) не приводило в результате к повышенному сигналу связывания. Подводя итоги, оказалось, что антитело P1-069366 перекрестно блокирует 13F3.A4 на основании результатов эксперимента по группированию эпитопов.

(2) 13F3.A4, 2G6.C2 блокировали связывание друг друга, а также HLA-E с человеческим NKG2A-CD94.

В еще одном эксперименте по группированию эпитопов и блокированию, который проводили на инструменте Octet HTX с использованием «сэндвич-формата», антитело 13F3.A4, антитело 2G6.C2, а также HLA-E исследовали в отношении одновременного связывания с человеческим NKG2A. Антитела и биотинилированный HLA-E захватывали на отдельных измерительных наконечниках Octet. Затем оставшиеся сайты для захвата блокировали, если требуется, и связывали человеческий NKG2A-CD94. Исследовали последующее связывание антитела 13F3.A4, антитела 2G6.C2 и HLA-E с ранее связанным NKG2A-CD94, осуществляя зондирование всех парных комбинаций этих трех образцов. Эти эксперименты по группированию эпитопов продемонстрировали, что антитела 13F3.A4 и 2G6.C2 блокируют связывание друг друга, а также HLA-E с человеческим NKG2A-CD94.

(3) Активность связывания у антитела 2G6.C2

Эксперименты на инструменте Octet также продемонстрировали связывание антитела 2G6.C2 не только с человеческим NKG2A-CD94, но также с конструкцией NKG2A яванского макака-CD94-mFc. Кинетические параметры связывания антитела 2G6.C2 с гетеродимерами человеческого NKG2A-CD94 и NKG2C-CD94 измеряли на инструменте Biacore T200 при температуре 37°C посредством захвата антитела на чипе CM4 с предварительно иммобилизированным антителом к hFc и пропускания антигенов в качестве анализируемых веществ с соответствующим диапазоном концентраций. Все данные сравнивали с двумя эталонами и аппроксимировали к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для оценки данных Biacore T200 версии 3.1. Эксперименты Biacore продемонстрировали, что антитело 2G6.C2 характеризовалось более слабой аффинностью связывания, чем антитело 13F3.A4, и что оно характеризовалось некоторой перекрестной реактивностью с NKG2C, как кратко изложено ниже.

Захваченное	Анализируемое вещество	k_a (1/M c)	k_d (1/c)	K_D (M)	Период полужизни комплекса антитело/анализируемое вещество (секунды)
2G6.C2	hNKG2A-CD94	$4{,}0\times10^{5}$	$3{,}6\times10^{-2}$	$9{,}1\times10^{-8}$	19
2G6.C2	hNKG2C-CD94	$2{,}8\times10^{4}$	$3{,}0\times10^{-2}$	$1{,}1\times10^{-6}$	23

Пример 6. Обнаружение дополнительных антител к NKG2A

Как показано на фиг. 32A-B, вариабельные участки тяжелой и легкой цепи определенных антител к NKG2A (13F3.A4, NKG2A.9 и NKG2A.11) подвергали выравниванию с применением программного обеспечения Clutsal 2.1. Это выравнивание приводило в результате к обнаружению антител к NKG2A со следующими консенсусными последовательностями CDR:

- HCDR1: SHSMN (SEQ ID NO: 10)
- HCDR2: AISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 11)
- HCDR3: EEWGLPFDY (SEQ ID NO: 12)
- LCDR1: RASQGI**S**SALA (SEQ ID NO: 13, для антитела NKG2A.9);
  RASQGI**P**SALA (SEQ ID NO: 154, для антитела NKG2A.11); или
  RASQGI**N**SALA (SEQ ID NO: 155, для антитела 13F3.A4).
- LCDR2: DASSLKS (SEQ ID NO: 14)
- LCDR3: QQFNSYPLT (SEQ ID NO: 15)

Пример 7. Разработка антитела NKG2A.9 с инертным Fc (IgG1.3) для снижения или предотвращения связывания с рецептором Fc-гамма (FcγR)

Поскольку NKG2A представляет собой ингибирующий рецептор, экспрессирующийся на CD8+ Т-клетках и NK-клетках, авторы настоящего изобретения полагали, что избежание или снижение агонизма или уменьшение количества $NKG2A^+$ CD8+ Т-клеток или NK-клеток усиливает противоопухолевый иммунитет. Таким образом, желательной являлась блокада взаимодействия NKG2A/HLA-E, при которой антитело к NKG2A неспособно взаимодействовать с человеческими FcγR.

Как кратко изложено в исследовании 1 ниже, авторы настоящего изобретения оценили роль изотипа в опосредовании ингибирования роста опухоли в модели саркомы 1956. Антитело NKG2A.2 представляет собой мышиное антитело-заменитель, полученное в виде изотипа mIgG2a или mIgG1-D265A для оценки роли Fc в противоопухолевой активности.

Исследование 1 в мышиной модели опухоли

Цель	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
Эффективность изотипов антител mNKG2A.2 IgG2a и NKG2A.2 IgG1-D265A	Саркома 1956	C57Bl/6 n=10/группа	NKG2A.2 (mIg2a) NKG2A.2 (mIgG1-D265A)	День 0: 1×10^6 клеток на мышь подкожно (SC) Дни 6, 9, 12: 10 мг/кг каждого изотипа внутрибрюшинно (IP)	<u>В День 21</u> NKG2A.2-g1 D265A: 41% NKG2A.2-g2a: 0%

В День 21 после имплантации NKG2A.2-mIGg1 D265A ингибировало рост опухоли на 41% по сравнению с изотипическим контролем. Иначе говоря, обработка несущих опухоль мышей mAb к mNKG2A, содержащим инертный Fc (mNKG2A.2 mIgG1-D265A), приводила к сильной противоопухолевой активности. Тем не менее, когда вводили NKG2A.2 mIgG2a, антитело не ингибировало рост опухоли. Иначе говоря, когда исследовали антитело NKG2A.2 с Fc, способным к взаимодействию с мышиными FcγR (mNKG2A.2 mIgG2a), опухоли росли быстрее *in vivo*.

Когда исследовали mAb к hNKG2A с Fc IgG4, оно ингибировало ответы NK-клеток, в особенности, в присутствии сильной стимуляции.

В совокупности эти данные демонстрировали благоприятные функции инертного Fc человеческого IgG1.3, который являлся предпочтительным изотипом для антитела NKG2A.9.

Пример 8. Антитело NKG2A.9 усиливало функциональную активность Т-клеток

В этом анализе антитело NKG2A.9 исследовали в отношении его функциональной активности, заключающейся в обращении ингибирования передачи сигнала с участием NK-κB в линии экспрессирующих NKG2A Т-клеток Jurkat, стимулируемых CHO/scOKT3/HLA-E (клетки яичника китайского хомячка, которые подвергли воздействию методов генной инженерии с целью экспрессии одной цепи OKT3 и лиганда, HLA-E). Экспрессирующие NKG2A эффекторные клетки Jurkat культивировали совместно с клетками-мишенями CHO/scOKT3/HLA-E при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T), составляющем 1:1. Антитело NKG2A.9 или антитело изотипического контроля (человеческий IgG1.3) добавляли к совместной культуре в поэтапно увеличиваемых концентрациях. После четырех часов стимуляции при температуре 37°C активность люциферазы количественно определяли с применением реактива Bio-Glo Reagent (100 мкл/лунка) и планшет-ридера EnVision. Данные в относительных единицах люциферазы (RLU) наносили на график с применением программного обеспечения Prism v5.01 от GraphPad Inc.

Антитело NKG2A.9 обращало опосредуемое NKG2A/HLA-E ингибирование Т-клеточных ответов. В частности, как показано на фиг. 33, антитело NKG2A.9 обращало ингибирование передачи сигнала с участием NK-κB в экспрессирующих NKG2A Т-клетках линии Jurkat, стимулируемых CHO/scOKT3/HLA-E, причем значение EC_{50} составляло 0,2 нМ.

Пример 9. Продуцирование IFN-γ под действием антитела NKG2A.9 отдельно и в комбинации с моноклональным антителом к PD-L1

Антитело NKG2A.9 индуцировало выработку IFN-γ в $NKG2A^+$ CD8 Т-клетках, выделенных из PBMC от здорового донора, культивируемых совместно с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 (клетки яичника китайского хомячка, которые были подвергнуты воздействию методов генной инженерии с целью экспрессии одной цепи OKT3 и лигандов HLA-E и PD-L1). Усиленное продуцирование IFN-γ является показателем усиленной функциональности Т-клеток. Эффект значительно усиливался, когда NKG2A.9 объединяли с моноклональным антителом к PD-L1.

Кратко, как показано на фиг. 34A, Т-клетки, выделенные из здоровых PBMC, инкубировали с облученными CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 в присутствии антитела NKG2A.9 и антитела к PD-L1 (BMS-936659) или их комбинации в течение четырех суток. Т-клетки выделяли из цельной крови человека с применением градиента плотности фиколла и набора для выделения человеческих Т-клеток (EasySep™ Human T Cell Isolation Kit, Stemcell Technologies). Жизнеспособность клеток составляла более 90%, что определяли с помощью устройства для подсчета клеток (Nexcelcom Cellometer Auto 2000). $1,5\times10^5$ клеток культивировали в течение четырех суток совместно с $2,5\times10^4$ облученных (67000 рад в течение 80 минут; аппарат для облучения Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) CHO/OKT3/HLA-E/PD-L1 клеток в содержащей rhIL-15 (5 нг/мл) среде в присутствии либо антитела изотипического контроля (человеческий IgG1.3), либо антитела NKG2A.9 и/или антитела к человеческому PD-L1 (BMS-936659). (CHO/scOKT3/HLAE/PD-L1 клетки представляют собой клетки яичника китайского хомячка, которые были подвергнуты воздействию методов генной инженерии с целью экспрессии одной цепи OKT3 и лигандов HLA-E и PD-L1). На четвертые сутки культивирования клетки собирали и окрашивали антителом к человеческому CD4, антителом к человеческому CD8, маркером, определяющим живые/мертвые клетки, антителом к человеческому NKG2A (клон 27H4). Продуцирование IFN-γ оценивали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов с применением набора BD Cytofix/Cytoperm™. Флуоресценцию в зафиксированных клетках считывали на BD LSRFortessa™. Процент IFN-γ в NKG2A+ или NKG2A- CD8 Т-клетках рассчитывали с помощью FlowJo.

Как показано на фиг. 34B, дозозависимое усиление продуцирования IFN-γ $NKG2A^+$ CD8 Т-клетками наблюдали, когда антитело NKG2A.9 объединяли с антителом к PD-L1. Примечательно, что повышение продуцирования IFN-γ не наблюдали на $NKG2A^-$ CD8 Т-клетках, что указывало на то, что эффект антитела NKG2A.9 являлся специфичным и характерным для $NKG2A^+$ CD8 Т-клеток.

Антитело NKG2A.9 также индуцировало выработку IFN-γ в $NKG2A^+$ CD8+ Т-клетках, выделенных из человеческих опухолей, культивируемых совместно с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1. Эффект значительно усиливался, когда антитело NKG2A.9 объединяли с моноклональным антителом к PD-L1 (BMS-936659). Кратко, как показано на фиг. 35A-B, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) из образцов почечно-клеточной карциномы, меланомы или эндометриальных опухолей культивировали совместно с облученными CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 в присутствии антитела NKG2A.9, антитела к PD-L1 или их комбинации в течение четырех суток. Антитело NKG2A.9 не повышало уровни IFN-γ, продуцируемого $NKG2A^+$ CD8 TIL, по сравнению с контрольным моноклональным антителом, тогда как антитело к PD-L1 стимулировало уровни IFN-γ, продуцируемого $NKG2A^+$ CD8 TIL, по сравнению с антителом изотипического контроля (P=0,01). Наибольший ответ в виде выработки IFN-γ наблюдали в случае комбинации антитела NKG2A.9 и mAb к PD-L1 по сравнению с антителом изотипического контроля (P=0,003), а также по сравнению с антителом к PD-L1 отдельно (P=0,04), как показано на фиг. 35B.

Пример 10. Антитело NKG2A.9 в соответствии с желаниями интернализировалось после связывания с экспрессирующей NKG2A клеткой

Как описано в примерах выше, авторы настоящего изобретения наблюдали понижающую регуляцию поверхностной экспрессии NKG2A после инкубирования человеческих CD8+ Т- или NK-клеток с антителом NKG2A.9. Для определения того, интернализировалось ли антитело NKG2A.9 в клетку, меченое Alexa Fluor 488 антитело NKG2A.9 или моноклональное антитело изотипического контроля (KLH-антитело IgG1 человека) добавляли к NKL клеткам и измеряли уровни внутриклеточных и связанных с поверхностью моноклональных антител. Интернализация антитела демонстрирует взаимодействие с мишенью у антитела с рецептором. Как показано на фиг. 36A, антитело NKG2A.9 демонстрировало интернализацию в течение одного часа, и ее уровень повышался в течение 20 часов. Антитело NKG2A.9 постепенно интернализировалось NKL клетками и достигало уровня плато приблизительно с 40% интернализацией через 20 часов. Для количественного определения интернализации антитела NKG2A.9 в дозозависимом формате анализ с применением pH-чувствительного красителя осуществляли при использовании NKL клеток. Как показано на фиг. 36B, через два часа антитело NKG2A.9 демонстрировало дозозависимую интернализацию с EC_{50}, составляющей 0,5 нМ.

Пример 11. Антитело NKG2A.9 повышало дегрануляцию клеток-натуральных киллеров и лизис экспрессирующих HLA-E опухолевых клеток

В экспериментах *in vitro* с применением PBMC от нормальных доноров блокада

антителом к NKG2A взаимодействия NKG2A/HLA-E у активированных NK-клеток приводила в результате к повышенной дегрануляции NK-клеток. Как показано на фиг. 37A, NK-клетки, выделенные из PBMC от нормальных доноров, активировали в течение ночи с использованием рекомбинантного человеческого (rh) IL-2. NK-клетки затем культивировали совместно с линией 721.221 человеческих B-лимфобластоидных клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-E. Как показано на фиг. 37B, антитело NKG2A.9 по сравнению с изотипическим контролем повышало дегрануляцию NK-клеток дозозависимым образом, что измеряли по % экспрессии CD107a с помощью проточной цитометрии. Обращение опосредуемого NKG2A/HLA-E ингибирования цитотоксичности NK-клеток оценивали *in vitro*. Как показано на фиг. 37C, HSC-3, линию клеток злокачественной опухоли ротовой полости человека, выбирали, исходя из эндогенной экспрессии в них HLA-E. NKL клетки культивировали совместно с клетками-мишенями HSC-3, мечеными кальцеином-AM (перманентный краситель для клеток), в соотношении эффектор:мишень, составляющем 20:1, в присутствии NKG2A.9 или антитела изотипического контроля (человеческий IgG1.3). Количество кальцеина, высвободившегося спустя два часа, измеряли и использовали для определения уровня лизиса клеток-мишеней. Как показано на фиг. 37D, антитело NKG2A.9 по сравнению с изотипическим контролем повышало лизис экспрессирующих HLA-E опухолевых клеток дозозависимым образом.

Пример 12. Антитело 13F3.A4 демонстрировало улучшенную функциональность NK-клеток

На фиг. 38A проиллюстрирован способ, применяемый для измерения влияния антитела 13F3.A4 на продуцирование IFN-γ в NKL клетках, культивируемых совместно с CHO/MICA/HLA-E. Аналогично антителу NKG2A.9 на фиг. 38B представлено, что антитело 13F3.A4 повышало продуцирование IFN-γ в лимфоцитах-натуральных киллерах (NKL), культивируемых совместно с CHO/MICA/HLA-E (клетки яичника китайского хомячка, которые были подвергнуты воздействию методов генной инженерии с целью экспрессии MICA и HLA-E), по сравнению с изотипическим контролем.

Пример 13. Сравнительные аффинности связывания NKG2A.9

Сравнение кинетических параметров и аффинностей связывания NKG2A.9, Z270 и монализумаба в отношении связывания с hNKG2A-hCD94 выполняли с применением инструмента-биосенсора Biacore T200 и гетеродимера внеклеточных доменов человеческого NKG2A и CD94. Температура составляла 37°C, и подвижный буфер представлял собой солевой буферный раствор Hepes (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl) с pH 7,4, дополненный 0,05% Tween-20 и 1 г/л BSA. Антитела захватывали на сенсорном чипе C1 с

предварительно иммобилизированным реактивом для захвата в виде антитела к человеческому Fc (Southern Biotech, номер в каталоге 2081-01). Внеклеточный домен человеческого NKG2A пропускали в качестве анализируемого вещества над захваченными антителами в двух сериях трехкратно изменяющихся концентраций (по пять концентраций), причем наибольшая концентрация составляла 250 нМ: одну серию концентраций применяли для определения кинетических параметров за один цикл, а другую - для определения кинетических параметров за несколько циклов с впрыскиванием в двух параллелях в концентрации 83 нМ. Все данные сравнивали с двумя эталонами и аппроксимировали к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для оценки данных Biacore T200 версии 3.1. Проводили два независимых прогона с применением отличающейся проточной кюветы для каждого моноклонального антитела во втором прогоне. Таким образом, проводили четыре измерения K_D. В случае, когда это было применимо, для анализа данных применяли модель, аппроксимирующую кинетику связывания, и модель, аппроксимирующую равновесное связывание.

На фиг. 51A-D представлена аффинность связывания антитела NKG2A.9 с гетеродимером человеческого NKG2A-CD94 при температуре 37°C, которая определена с помощью измерений Biacore при измерениях в четырех повторностях с применением определения кинетических параметров как за один цикл, так и за несколько циклов. На фиг. 51A-D показана зависимость связывания NKG2A-CD94 в единицах ответа (RU) от времени в секундах.

В этом анализе антитело NKG2A.9 демонстрировало более высокую аффинность (K_D=16 нМ ± 0,4 нМ; среднее значение ± стандартное отклонение), чем Z270 (K_D = 25 нМ ± 3 нМ) и монализумаб (K_D = 26 нМ ± 3 нМ), как кратко изложено в таблице ниже. В этом анализе общая аффинность для NKG2A.9 являлась более высокой, чем в эксперименте с применением Fab NKG2A.9 в примере 3; различие может быть обусловлено большей скоростью ассоциации (k_a), тогда как скорость диссоциации (k_d) являлась очень похожей. Большая скорость ассоциации (k_a) в этом анализе может являться отражением более оптимизированных условий, в частности, применением плоского сенсорного чипа, который применяли вследствие меньших ограничений по реактивам для человеческого NKG2A в сравнении NKG2A яванского макака.

Таблица. Сравнительная аффинность антител к NKG2A и период полужизни комплекса антитело/анализируемое вещество

Захваченное антитело	**Анализируемое вещество**	**k_a (1/M c)**	**k_d (1/c)**	**K_D (нМ)**	**Период полужизни комплекса антитело/ анализируемое вещество (секунды, с)**
NKG2A.9	hNKG2A-hCD94	$1,1\times10^{6}\pm 0,1\times10^{6}$	$1,7\times10^{-2}\pm 0,2\times10^{-2}$	16,0 нМ± 0,4 нМ	37-45 с
Z270		8×10^{6}	2×10^{-1}	25 нМ± 3 нМ	от 3 с до 4 с
Монализумаб		7×10^{6}	2×10^{-1}	26 нМ± 3 нМ	от 3 с до 4 с

K_D усредняли для четырех измерений. Стандартное отклонение показано там, где это применимо.

Период полужизни комплекса в соотношении 1:1, такого как один сайт связывания антитела, связанный с одним гетеродимером NKG2A-CD94, представляет собой время, которое требуется для того, чтобы диссоциировала половина количества комплекса антитело/анализируемое вещество (в данном случае комплекса антитело:NKG2A-CD94). Период полужизни может быть математически описан как $\ln(2)/k_d$. Период полужизни комплекса антитело:NKG2A-CD94 был примерно 12-кратно продолжительнее для NKG2A.9 (41 секунда), чем для обоих из Z270 и монализумаба (от 3 до 4 секунд).

В условиях моновалентного связывания на клеточной поверхности (например, вследствие низкой экспрессии антигена) NKG2A.9, следовательно, может взаимодействовать с комплексом NKG2A-CD94 в течение более продолжительного периода времени, чем Z270 и монализумаб. Авторы настоящего изобретения полагают, что этот более продолжительный период полужизни комплекса антитело/NKG2A-CD94 обеспечивает повышенную эффективность при блокировании лиганда. Иначе говоря, продолжительный период полужизни комплекса NKG2A.9/NKG2A-CD94 по сравнению с комплексом монализумаб/NKG2A-CD94 или Z270/NKG2A-CD94 представлял доказательство способности антитела NKG2A.9 лучше блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E по сравнению с монализумабом или Z270.

Пример 14. Свойства антител к mNKG2A *in vitro*

Антитела-заменители к mNKG2A, NKG2A.2 (клон 20D5, eBioscience, mIgG1-D265A) и NKG2A.3 (клон 7E6, mIgG1-D265A), характеризовались функциональными

свойствами, подобными антителу NKG2A.9, при оценке *in vitro*, что позволяет этим антителам служить в качестве антител-заменителей для исследований по экспериментальной проверке концепции, механизма действия (MOA) и проецирования дозы на человека. Мышиные антитела к NKG2A NKG2A.2 и NKG2A.3 имели следующие функциональные свойства:

1) Значения EC_{50} для связывания с экспрессирующими mNKG2A CHO клетками составляли 0,2 нМ (NKG2A.2) и 0,3 нМ (NKG2A.3).
2) Значения IC_{50} для блокады связывания тетрамера Qa-1b с экспрессирующими mNKG2A CHO клетками составляли 0,3 нМ (NKG2A.2) и 0,4 нМ (NKG2A.3). (Qa-1b представляет собой мышиный гомолог HLA-E у людей. Следовательно, оно является сравнимым с анализом блокирования CHO hNKG2A/HLA-E).
3) NKG2A.2 и NKG2A.3 специфично связывались с mNKG2A, поскольку они не связывались с $NKG2A^{-/-}$ NK или CD8 T-клетками.
4) Антитела NKG2A.2 и NKG2A.3 индуцировали дозозависимое повышение дегрануляции мышиных NK-клеток.

Пример 15. Антитела к mNKG2A как отдельно, так и в комбинации с другими средствами индуцировали противоопухолевую активность *in vivo*

(1) Антитела к mNKG2A индуцировали противоопухолевую активность в качестве монотерапии в мышиных моделях

Моноклональные антитела к mNKG2A (в том числе антитела NKG2A.2 и NKG2A.3) при введении в виде отдельного средства ингибировали опухолевый рост в подкожных (SC) моделях карциномы кишечника CT26, саркомы 1956 и B-клеточной лимфомы A20, как кратко изложено в исследовании 2 ниже.

Краткое изложение исследований 2-4 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
2	Подбор дозы антитела к mNKG2A.3	Карцинома толстой кишки CT26	BALB/c n =10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIGg1 D265A)	День 0: 1×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 10, 13, 17, 20: NKG2A 10, 3, 1, 0,3 мг/кг внутрибрюшинно (IP) PD-1 (mPD1-4h2-mg1-D265A, мышиный заменитель для ниволумаба) 10 мг/кг IP Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 20</u> **NKG2A.3 (10 мг/кг) + Ab к PD-1: 96%** **NKG2A.3 (1 мг/кг) + Ab к PD-1: 96%** **Ab к PD-1: 88%** NKG2A.3(3 мг/кг) + Ab к PD-1: 76% NKG2A.3(0,3 мг/кг) + Ab к PD-1: 71% NKG2A.3 (3 мг/кг): 56% NKG2A.3(10 мг/кг): 49% NKG2A.3(1 мг/кг): 31% NKG2A.3(0,3 мг/кг): 0%
3	Эффективность антитела к mNKG2A.3 в комбинации с другими ингибиторами контрольных точек	Карцинома толстой кишки CT26	BALB/c n =10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1 D265A) Ab к TIGIT (mIg2a)	День 0: 1×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 10, 13, 17, 20: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 24</u> **NKG2A.3 +Ab к PD-1 (клон 4H2, mIgGg1-D265aA: 91%** **NKG2A.3 + Ab к TIGIT (клон 4H2, mIgG1-D265A: 88%** NKG2A.3: 42%

						Ab к PD-1: 61% Ab к TIGIT: 78%
4	Эффективность антитела к mNKG2A.2 в комбинации с ингибиторами контрольных точек в подкожной модели лимфомы	B-клеточная лимфома A20	BALB/c n = 10/группа	NKG2A.2 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A) Ab к TIGIT (mIg2a)	День 0: 5×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 9, 12, 15, 18: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 23</u> **NKG2A.3+Ab к PD-1: 94%** Ab к PD-1: 75% NKG2A.3: 58% NKG2A.3+Ab к TIGIT: 51% Ab к TIGIT: 32%
						<u>Мыши, у которых отсутствовали опухоли в конце исследования</u> **Антитело к NKG2A A + Ab к PD-1: у 8/9 мышей отсутствовали опухоли в конце исследования (TF)** Ab к NKG2A +Ab к TIGIT: 4/9 TF Ab к PD-1: 3/9 TF Ab к NKG2A: 1/9 TF Ab к TIGIT: 0/9 TF Изотипический контроль: 0/9 TF

Как показано на фиг. 39, в исследовании по подбору дозы (исследование № 2, описанное выше) при использовании модели опухоли CT26 антитело NKG2A.3 уменьшало размер опухоли при введении в дозах 10 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг (48%, 56% и 30% снижение среднего объема опухоли, соответственно).

(2) Комбинация антитела к mPD-1 и антитела к mNKG2A усиливала противоопухолевую активность по сравнению любым одним средством отдельно в нескольких мышиных моделях опухолей.

Совместная блокада с использованием антитела к NKG2A (mNKG2A.3-mG1-D265A (клон 7E6) и антитела к PD-1 (PD1-4H2-mG1-D265A, клон 6A1) снижала рост опухолей в моделях, где моноклональное антитело к NKG2A отдельно демонстрировало активность одного средства. Комбинация антитела к mPD-1 и антитела к mNKG2A демонстрировала антитела большую противоопухолевую активность, чем любое одно средство отдельно в модели опухоли CT26.

В модели CT26 обработка одним средством при использовании антитела к mNKG2A или антитела к mPD-1 снижала средний объем опухоли на 43% и 61%, соответственно. Совместная блокада NKG2A и PD-1 приводила к относительно более сильному ингибированию опухолевого роста, причем у 7/10 мышей отсутствовали опухоли (TF) в конце исследования (фиг. 40D), и наблюдали 91% снижение среднего объема опухоли (фиг. 40E). На фиг. 40A-D представлен объем опухоли в различные моменты времени после имплантации опухолей мышам (n=10/группа), получавшим обработку изотипическим контролем (фиг. 40A), антителом к mNKG2A отдельно (фиг. 40B), антителом к mPD-1 отдельно (фиг. 40C) или комбинацией антитела к mNKG2A и антитела к mPD1 (фиг. 40D). На фиг. 40E представлен средний объем опухоли в зависимости от времени (количество суток после имплантации опухоли) у мышей, получавших обработку изотипическим контролем, антителом к mNKG2A отдельно, антителом к mPD-1 отдельно или комбинацией антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1.

Подобные эффекты наблюдали у мышей, которых инокулировали SC опухолями саркомы 1956 или лимфомы A20, как кратко изложено в исследованиях 3 и 4 ниже.

Краткое изложение исследований 3 и 4 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
3	Эффективность антитела к mNKG2A.3 в комбинации с другими ингибиторами контрольных точек	Карцинома толстой кишки CT26	BALB/c n =10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIGg1 D265A) Ab к TIGIT (mIg2a)	День 0: 1×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 10, 13, 17, 20: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 24</u> **NKG2A.3 +Ab к PD-1: 91%** **NKG2A.3 + Ab к TIGIT (клон 10A7, mIgG1-D265A): 88%** NKG2A.3: 42% Ab к PD-1: 61% Ab к TIGIT: 78%
4	Эффективность антитела к mNKG2A.2 в комбинации с ингибиторами контрольных точек в подкожной модели лимфомы	B-клеточная лимфома A20	BALB/c n = 10/группа	NKG2A.2 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A) Ab к TIGIT (mIg2a)	День 0: 5×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 9, 12, 15, 18: Каждое антитело водили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 23</u> **NKG2A.3+ Ab к PD-1: 94%** Ab к PD-1: 75% NKG2A.3: 58% NKG2A.3+ Ab к TIGIT: 51% Ab к TIGIT: 32%
						<u>Мыши, у которых отсутствовали опухоли в конце исследования</u> **NKG2A+Ab к PD-1: у 8/9 мышей отсутствовали опухоли в конце исследования (TF)** NKG2A+Ab к TIGIT: 4/9 TF Ab к PD-1: 3/9 TF

						NKG2A: 1/9 TF Ab к TIGIT: 0/9 TF Изотипический контроль: 0/9 TF

Совместная блокада NKG2A/PD-1 улучшала ингибирование опухолевого роста даже в моделях, где моноклональные антитела к NKG2A отдельно (NKG2A.3-mG1-D265A (клон 7E6) или NKG2A.2-mg1-D265A (клон 4F12)) не демонстрировали активность одного средства. В модели опухоли легкого M109 совместная блокада антителом к NKG2A и антителом к PD-1 приводила к 72% снижению среднего объема опухоли по сравнению с изотипическим контролем, как кратко изложено в исследовании 5 ниже.

Краткое изложение исследования 5 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
5	Эффективность антитела к mNKG2A.2 в комбинации с антителом к mPD-1	Карцинома легкого M109	BALB/c n = 10/группа	NKG2A.2 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A)	День 0: 2×10^5 клеток на мышь SC Дни 7, 10, 13: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 25</u> NKG2A+Ab к PD-1: 72% Ab к PD-1: 17% Ab к NKG2A: 11%

В модели опухоли яичника BR5.1 совместная блокада NKG2A и PD-1 приводила к 36% снижению среднего объема опухоли по сравнению с изотипическим контролем, как кратко изложено в исследовании 6 ниже.

Краткое изложение исследования 6 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
6	Эффективность антитела к mNKG2A.2 в комбинации с антителом к mPD-1	BR5.1 яичника	FVB/NJ n = 15/группа	NKG2A.2 (mIgG1-D265A) PD-1 (mIgG1-D265A)	День 0: Фрагментированные опухоли SC Дни 5, 8, 11, 14, 17: NKG2A.2 10 мг/кг IP PD-1 5 мг/кг IP	<u>В День 26</u> NKG2A+PD-1: 36% NKG2A: 5% PD-1: 0%

Авторы настоящего изобретения не наблюдали активность антитела к mNKG2A отдельно или в комбинации с антителом к mPD-1 в модели карциномы толстой кишки MC38, как показано в исследовании 7 ниже.

Краткое изложение исследования 7 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
7	Эффективность антитела к mNKG2A.3 с антителом к mPD-1	Аденокарцинома толстой кишки MC38	C57Bl/6 n = 10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) PD-1 (mIgG1-D265A)	День 0: 1e6 клеток на мышь SC Дни 6, 8: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	Эффективность не наблюдали

(3) Антитело к NKG2A и антитело к PD-1 усиливало противоопухолевую активность и функциональность мышиных клеток-натуральных киллеров (NK) и CD8 опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL).

Эффективность совместной блокады NKG2A/PD-1 зависела от как от CD8+ T-клеток, так и от NK-клеток. У несущих CT26 мышей уменьшали количество либо CD8+ T-клеток, либо NK-клеток перед обработкой моноклональным антителом к mNKG2A и моноклональным антителом к mPD-1. Мыши, получавшие обработку антителом к mNKG2A (NKG2A.3, клон 7E6, mIgG1-D265A)/антителом к mPD-1 (клон 4H2, mIgG1-D265A), имели увеличение среднего объема опухоли при уменьшении количества либо CD8+ T-клеток (191% повышение, средний объем опухоли 2271±699 мм^3), либо NK-клеток (94% повышение, средний объем опухоли 1509±800 мм^3) по сравнению с мышами, которые не получали истощающие моноклональные антитела (средний объем опухоли 778±686 мм^3), как кратко изложено в исследовании 8 ниже.

Краткое изложение исследования 8 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
8	Уменьшение количества NK и CD8 Т-клеток	Карцинома толстой кишки CT26	BALB/c n = 10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) PD-1 (mIgG1-D265A) Антитело к асиало-GM1 (e-Bioscience) Антитело к CD8a (53.6.7, BioXCell)	День 0: 1e6 клеток на мышь SC Дни 5, 12, 19: Антитело к асиало-GM1 (50 мкг/мышь) или антитело к CD8a (200 мкг/мышь) IP Дни 6, 10, 13, 17, 20: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 21</u> NKG2A.3+PD-1: 60% NKG2A.3+PD-1+антитело к асиало-GM1: 22% NKG2A.3+PD-1+антитело к CD8: 0%

Совместная блокада NKG2A/PD-1 усиливала функциональность NK и CD8+ T TIL. После четырех доз моноклональных антител (День 12 после начала обработки) NK и CD8+ T TIL анализировали с помощью проточной цитометрии. Обработка антителом к mNKG2A/антителом к mPD-1 приводила к повышенной частоте $CD107a^+$ NK-клеток по сравнению с группами, получавшими обработку изотипическим контролем, как показано на фиг. 41A. Исследования иммунофенотипирования в модели CT26 демонстрировали, что совместная блокада антителом к NKG2A и антителом к PD-1 демонстрировала статистически значимое повышение цитотоксичности и выработки IFN-γ у NK и опухолеспецифических CD8+ T-клеток. Обработка антителом к mNKG2A/антителом к mPD-1 приводила к повышенной частоте $CD107a^+$ NK-клеток примерно с 1,5-кратным повышением относительно группы, получавшей обработку изотипическим контролем. Аналогичное повышение частоты цитотоксических CD8+ T-клеток наблюдали среди опухолеспецифических $AH\text{-}1^+$ CD8+ T-клеток, как показано на фиг. 41B, примерно с 13-кратным повышением CD107a+ гранзим B+ AH1+ CD8 T-клеток относительно группы, получавшей обработку изотипическим контролем. Совместная блокада NKG2A/PD-1 также повышала частоту продуцирующих IFN-γ $AH\text{-}1^+$ CD8+ T-клеток примерно с 5,5-кратным повышением IFN-γ+ $AH\text{-}1^+$ CD8+ T-клеток относительно группы, получавшей обработку изотипическим контролем, как показано на фиг. 41C.

Подводя итог, следует отметить, что антитело к NKG2A и антитело к PD-1 либо отдельно, либо в комбинации повышали частоту цитотоксических CD8+ T-клеток среди опухолеспецифических $AH\text{-}1^+$ CD8 T-клеток. Введение антитела к NKG2A и антитела к PD-1 повышало цитотоксичность и выработку IFN-γ NK и опухолеспецифическими CD8 T-клетками в модели CT.

(4) Антитела к mPD-1 ингибировали опухолевый рост в большей степени при объединении с антителом к mNKG2A по сравнению с комбинацией с антителом к mLAG-3 или антителом к mTIGIT в мышиной модели саркомы.

Ранее было показано, что двойная блокада PD-1 с использованием антитела к LAG-3 и антитела к PD-1 с антителами к TIGIT синергично замедляла опухолевый рост по сравнению с обработкой одним средством в мышиных моделях опухолей. (Woo *et al.*, "Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape." Cancer Res 72:917-27 (2012); Johnston RJ *et al.*, "The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8 (+) T cell effector function." Cancer Cell 26:923-937 (2014).

Авторы настоящего изобретения оценивали влияние комбинирования антитела к mPD-1 с одним из антитела к mNKG2A (NKG2A.3, клон 7E6, mIgG1-D265a), антитела к

mLAG-3 (клон 1A5, mIgG1-D265A) или антитела к mTIGIT (клон 10A7, mIgG1-D265A) на контроль опухолевого роста в модели саркомы 1956, как кратко изложено в исследовании 9 ниже.

Краткое изложение исследования 9 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
9	Эффективность антитела к mPD-1 в комбинации с антителом к mNKG2A.3 и другими ингибиторами контрольных точек	Саркома 1956	C57Bl/6 n = 10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A) TIGIT (mIgG1-D265A) Ab к LAG-3 (mIgG1-D265A)	День 0: $1x10^6$ клеток на мышь SC Дни 6, 9, 12, 15, 18: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>В День 27</u> **NKG2A.3 + Ab к PD-1: 97%** **Ab к PD-1 + Ab к LAG-3: 91%** Ab к PD-1: 77% Ab к PD-1 + Ab к TIGIT: 72% NKG2A.3-D265A: 24% Ab к LAG-3-D265A: 0% Ab к TIGIT-D265A: 0% <u>Мыши, у которых отсутствовали опухоли в конце исследования (TF)</u> **NKG2A+PD-1: 6/10 TF** LAG-3+PD-1: 4/10 TF PD-1: 2/10 TF PD-1+TIGIT: 1/10 TF NKG2A: 1/10 TF LAG-3: 0/10 TF TIGIT: 0/10 TF Изотипический контроль: 0/10 TF

Двойная блокада PD-1/NKG2A демонстрировала наиболее сильную противоопухолевую эффективность (у 6/10 мышей отсутствовали опухоли) по сравнению с комбинацией 1) антитела к PD-1/антитела к LAG-3 (у 4/10 мышей отсутствовали опухоли) и 2) антитела к PD-1/антитела к TIGIT (у 1/10 мышей отсутствовали опухоли).

Антитела к mNKG2A комбинировали с другими ингибиторами контрольных точек, в том числе с антителом к mCTLA-4 и антителом к LAG-3, для усиления противоопухолевой эффективности в нескольких мышиных моделях опухолей. В модели 1956 антитело к mNKG2A демонстрировало сильную активность при комбинировании с антителом к mCTLA-4 с 87% снижением среднего объема роста опухоли, и при этом у 3/10 мышей отсутствовали опухоли, по сравнению с изотипическим контролем, как описано в исследованиях, кратко изложенных в исследовании 10 и на фиг. 42A-E.

Краткое изложение исследования 10 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb (с изотипом в круглых скобках)**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
10	Эффективность антитела к mNKG2A.3 в комбинации с более низкими дозами других ингибиторов контрольных точек	Саркома 1956	C57Bl/6 n = 10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A) Ab к CTLA-4 (mIgG2a)	День 0: 1×10^6 клеток на мышь SC Дни 6, 9, 12: NKG2A: 10 мг/кг IP Ab к PD-1: 0,3 мг/кг IP Ab к CTLA-4: 0,1 мг/кг IP	<u>В День 22</u> NKG2A.3+Ab к CTLA-4: 86% NKG2A.3+Ab к PD-1: 76% Ab к CTLA-4 mIgG2a: 51% NKG2A.3: 26% Ab к PD-1 mIgG1 D265A: 25%

На фиг. 42A-E представлена противоопухолевая активность антитела к mNKG2A (10 мг/кг) и антитела к mCTLA-4 (0,1 мг/кг) либо отдельно, либо в комбинации в мышиной модели саркомы 1956. На фиг. 42A-D представлен объем опухоли в различные моменты времени после имплантации опухолей мышам, получавшим обработку изотипическим контролем (фиг. 42A), антителом к mCTLA-4 (фиг. 42B, CTLA-4 IgG2a, 0,1 мг/кг), антителом к mNKG2A (фиг. 42C, 10 мг/кг) или комбинацией антитела к mNKG2A и антитела к mCTLA-4 (фиг. 42D). На фиг. 42E представлен средний объем опухоли в зависимости от времени (количество суток после имплантации опухоли) у мышей, получавших обработку изотипическим контролем, антителом к mCTLA-4 отдельно, антителом к mNKG2A отдельно или комбинацией антитела к mNKG2A и антитела к mCTLA-4.

Во внутривенной модели лимфомы A20 антитело к NKG2A отдельно оказывало благоприятное воздействие на выживание с 10% показателем выживаемости. Комплексная терапия любым из антитела к mPD-1 или антитела к mLAG-3 продлевала благоприятное воздействие на выживание до 50% и 70%, соответственно. Тройная комбинация антитела к mNKG2A, антитела к mPD-1 и антитела к mLAG-3 обеспечивала наибольшее благоприятное воздействие с 80% показателем выживаемости, как кратко изложено в исследовании 11 ниже и показано на фиг. 43.

Краткое изложение исследования 11 в мышиных моделях опухолей

№ исследования	**Цель**	**Модель опухоли**	**Мыши-реципиенты**	**mAb (с изотипом в круглых скобках)**	**Схема обработки**	**% ингибирование роста опухоли** (по сравнению с изотипическим контролем)
11	Выживаемость после обработки антителом к mNKG2A.3 в комбинации с ингибиторами контрольных точек в IV модели лимфомы	B-клеточная лимфома A20	BALB/c n = 10/группа	NKG2A.3 (mIgG1-D265A) Ab к PD-1 (mIgG1-D265A) Антитело к LAG-3 (mIgG1-D265A)	День 0: 2×10^5 клеток на мышь IV Дни 4, 7, 10, 13, 16: Каждое антитело вводили в дозе 10 мг/кг IP	<u>% выживаемость в День 60:</u> Ab к NKG2A+Ab к PD-1+Ab к LAG-3: 80%, P=<0,0001 Ab к NKG2A+Ab к LAG-3:70%, P=0,0004 Ab к NKG2A+Ab к PD-1: 50%, P=0,006 Ab к LAG-3: 40%, P=0,001 Ab к PD-1: 20%, P=<0,0001 Ab к NKG2A: 10%, P=0,028 (P-значение по сравнению с изотипическим контролем)

На фиг. 43 представлена противоопухолевая активность антитела к mNKG2A, антитела к PD-1, антитела к LAG3 как отдельно, так и в комбинации в модели системной лимфомы A20. В частности, на фиг. 43 представлено процентное значение выживаемости в различные моменты времени после имплантации опухоли мышам (n=10/группа), получавшим обработку изотипическим контролем, антителом к mNKG2A, антителом к mPD-1, антителом к LAG3 отдельно или их комбинацией.

Взятые в совокупности, эти данные демонстрировали, что комбинаторная блокада антителом к NKG2A, антителом к PD-1, антителом к CTLA-4 и антителом к LAG-3 характеризовалась усиленной эффективностью в снижении опухолевого роста у мышей.

(5) Моноклональное антитело к mNKG2A, которое вводили *in vivo*, снижало количество поверхностного NKG2A на мышиных NK клетках

После обработки моноклональным антителом к mNKG2A (NKG2A.3 (клон 7E6), mIgG1-D265A) уровень экспрессии NKG2A снижался как на NK-клетках в селезенке, так и на TIL NK-клетках по сравнению с изотипическим контролем, как показано на фиг. 44. На фиг. 44 представлен процент экспрессирующих NKG2A NK-клеток среди NKG2A+ NK-клеток, который измеряли на пятые сутки после первой обработки в селезенке и опухоли в мышиной модели карциномы толстой кишки CT26. Авторы настоящего изобретения наблюдали понижающую регуляцию экспрессии NKG2A после введения антитела к NKG2A, что указывало на то, что его можно применять в качестве маркера взаимодействия с мишенью. Понижающая регуляция относится к понижающей регуляции экспрессии NKG2A на поверхности. Взаимодействие с мишенью означает, что антитело к NKG2A взаимодействует с рецептором NKG2A.

Вместе с данными интернализации, обсуждаемыми в настоящем документе, эти данные подтверждают, что понижающая регуляция NKG2A будет служить в качестве маркера взаимодействия с мишенью для антитела NKG2A.9.

Пример 16. Биофизические свойства, аффинность, и картирование эпитопов, и иммуногенность

Как описано в настоящем документе, вариабельную последовательность полностью человеческого моноклонального антитела к NKG2A NKG2A.9 получали из гибридомы 13F3.A4 с обратной мутацией VH-I107T в эмбриональный тип и с мутацией VK-N30S для уменьшения недостатка в виде предрасположенности к дезамидированию по аминокислотному остатку VK-N30. Константный участок получали из остова IgG1f (IgG1.3), и он включает в себя три мутации на тяжелой тяжелой цепи: L234A, L235E и G237A для сведения к минимуму или исключения связывания антитела с Fcγ рецепторами и C1q. Антитело NKG2A.9 также известно как 13F3-VH-I107T-VH-N30S IgGf1.3 и

NKG2A.9 IgGf1.3. В таблице ниже кратко изложены биофизические характеристики антитела NKG2A.9 на основании анализа материала, полученного из системы для транзиентной экспрессии ExpiCHO.

Свойство	Способ	Результаты
Идентификационная информация	SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) Пептидная карта по результатам LC-MS/MS	Подтвержденные полосы тяжелой и легкой цепей Молекулярная масса в дегликозилированном состоянии (MW) = 143683 Дальтон (Да) (как прогнозировали) *Тяжелая цепь (HC): наблюдаемое 48893 Да, предполагаемое 48900 Да, прогнозируемое 48900 Да *Легкая цепь (LC) = наблюдаемое 23207 Да, предполагаемое 23211 Да, прогнозируемое 23210 Да >99% структуры последовательности и дисульфидных мостиков подтверждали с помощью пептидного картирования и масс-спектрометрии. Подтверждали изоформы и гликозилирование по N-297 на тяжелой цепи.
Чистота/гомогенность	CE-SDS (капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия) SEC (гель-хроматография) SE-MALS (комбинация гель-хроматографии с анализом многоуглового светорассеяния) HIC-HPLC (хроматография гидрофобного взаимодействия-высокоэффективная жидкостная хроматография)	Невосстановленное (NR): 97,0% мономер, примеси включают 2,1% HHL (тяжелая цепь-тяжелая цепь-легкая цепь), 0,4% HL (тяжелая цепь-легкая цепь), 0,1% HH (тяжелая цепь-тяжелая цепь), 0,3% Восстановленное (R): LC 29,5%, HC 69,8%, NGHC 0,7% 98,1% мономер 95,2% (146 кДа), 2,63% (505 кДа), 1,6% (109 кДа) 86,4% основной пик в момент времени 35,5 минут, 13,6% до основного пика, GOF (78%), G1F (17%), G2F (1%), Man5 (4%),

212

Свойство	Способ	Результаты
	CE (капиллярный электрофорез, гликаны) cIEF (капиллярное изоэлектрическое фокусирование)	pI основного пика = 8,9 (59%), кислотные вещества 35%, Основные вещества 7%; диапазон pI 8,6-9,1
Химические модификации	Пептидная карта по результатам LC-MS/MS (жидкостная хроматография-тандемная масс-спектрометрия)	Очень низкий уровень
Аффинность в отношении человеческого NKG2A**	Biacore	K_D = 36 нМ (модель связывания 1:1); k_a (1/M c) = $3,0\times10^5$, k_d (1/c) = $1,1\times10^{-2}$ при 37°C; перекрестно реагирует с NKG2A яванского макака
Термическая стабильность и обратимость	DSC (дифференциальный сканирующий калориметр) (разбавленный в буфере для хранения)	Tm1 = 68°C, Tm2 = 75°C, Tm3 = 83°C Обратимость при 68ºC = 92%, при 75°C = 49%

* Метод дегликозилирования и частичного восстановления, применяемый для подтверждения массы легкой и тяжелой цепи.

** Гетеродимер человеческого NKG2A-CD94 (hNKG2A-CD94-mFc) применяли в качестве антигена для исследований связывания.

213

Биофизические свойства антитела NKG2A.9 являлись благоприятными. Идентичность антитела NKG2A.9 подтверждали с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрического анализа. Чистота антитела составляла больше 98%, что определяли с помощью гель-хроматографии (SEC). Один сайт N-гликозилирования подтверждали в положении N297 на тяжелой цепи, причем гликановый профиль соответствовал гликановому профилю моноклональных антител IgG1, экспрессирующихся в CHO клетках. На них обнаруживали только фукозилированные гликаны (G0f, G1f, G2f и Man5). Антитело NKG2A.9 характеризовалось хорошей термической стабильностью и обратимостью денатурации, что означает, что антитело сохраняло свою структурную целостность в условиях термического стресса и характеризовалось умеренными свойствами рефолдинга при ослаблении стресса.

Пример 17. Доклинические фармакокинетические исследования

Фармакокинетические данные подтверждали эффективность антитела NKG2A.9. После внутривенного (IV) введения яванским макакам NKG2A.9 демонстрировало линейные фармакокинетические (PK) характеристики антитела в дозах ≥0,5 мг/кг, причем прогнозируемый период полувыведения (T1/2) у человека составлял 16 суток. Предполагали, что эффективная доза у человека, нацеленная на достижение минимальной концентрации на спаде в равновесном состоянии ($C_{trough,ss}$) для достижения полной (99%) занятости рецепторов (RO) в крови, будет составлять 2,5 мг/кг IV, раз в четыре недели. Доза после подкожного (SC) введения может варьировать в зависимости от биологической доступности SC у людей (как правило, 50-100%) и от того, улучшает ли малая скорость SC абсорбции $C_{trough,ss}$.

Попытки получения составов показали, что платформенный подход к получению составов можно применять для готового к употреблению состава (RTU). Предварительная оценка вязкости и стабильности антитела NKG2A.9 в высокой (150 мг/мл) концентрации и прогнозируемой эффективной дозе для человека (2,5 мг/кг) указывает на то, что подкожное введение может быть возможно в условиях оптимизированного получения составов.

Токсикологические данные демонстрировали, что антитело NKG2A.9 можно вводить безопасно. Дозы 0 мг/кг, 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг у яванских макаков хорошо переносились без идентифицированных аномалий. Занятость рецепторов в День 43 (36%, 84% и 97% для доз 0,1 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно) и взаимодействие с мишенью (уменьшение количества NKG2A на поверхности) демонстрировались во всех дозах. Понижающая регуляция относится к понижающей регуляции экспрессии NKG2A на поверхности. Авторы настоящего изобретения наблюдали понижающую регуляцию экспрессии NKG2A после введения антитела, что указывало на то, что его можно применять

в качестве маркера взаимодействия с мишенью (т.е. антитело к NKG2A взаимодействует с рецептором NKG2A).

Пример 18. Фармакокинетические параметры антител к mNKG2A.3 у мышей

Фармакокинетические исследования проводили с использованием мышиного антитела-заменителя к mNKG2A (NKG2A.3), которое имело свойства, подобные антителу NKG2A.9, после внутривенного (IV) или внутрибрюшинного (IP) введения C57BL6 мышам. В **таблице 3** представлены фармакокинетические параметры, полученные в результате этих исследований.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры мышиного антитела-заменителя к mNKG2A (NKG2A.3) после IV и IP введения C57BL6 мышам (среднее значение ± стандартное отклонение (SD), n = 4 или 5)*

Путь введения	Доза (мг/кг)	Cmax (нМ)	Tmax (часы)	AUCtot (мкМ × сутки)	T1/2 (сутки)	CLT (мл/сутки/кг)	Vss (мл/кг)
IV	0,3	24±6,8	0,25±0**	0,075±0,010	3,2±0,2	26±3,5	121±16
(не несущие опухоль)	1	79±7,8	0,25±0**	0,38±0,036	3,9±0,5	17±1,7	108±15
	10	940±327	0,25±0**	7,3±2,0	9,4±2,5	9,7±2,5	128±19
IP	0,1	6,9±0,8	2±0	0,014±0,004	н.д.	н.д.	н.д.
(несущие опухоль)	10	993±87	2±0	8,0±1,1	н.д.	н.д.	н.д.

Примечание: PK параметры получали с применением анализа без компартментализации данных зависимости концентрации лекарственного средства в сыворотке крови от времени. н.д. означает нет данных.

*Уровни лекарственного средства в сыворотке крови получали в результате серийного забора микрообразцов и корректировали либо с учетом теоретического коэффициента разведения 17, либо экспериментально определенного коэффициента разведения 20; **момент первого забора образца.

Антитело NKG2A.3 демонстрировало нелинейную фармакокинетику у мышей. При соотношении внутривенных доз 1:3:30 соотношение значений площади под кривой (AUC) составляло 1:5,1:97. Конечный период полувыведения повышался с 3,2 суток до 9,4 суток, когда дозы повышали с 0,3 мг/кг до 10 мг/кг. Аналогично, при соотношении IP доз 1:100 соотношение значений AUC составляло 1:571 при дозах от 0,1 до 10 мг/кг. Кроме того, образование антител к лекарственному средству (ADA) не оказывало значимое воздействие на PK NKG2A.3. В соокупности эти данные демонстрировали, что антитело NKG2A.3 подвергалось опосредованному мишенью распределению лекарственного средства (TMDD) у мышей.

Биологическая доступность при IP введении являлась полной при сравнении со значениями AUC при дозе 10 мг/кг между IV и IP путями. Кроме того, не отсутствовало видимое различие в системном воздействии между несущими опухоль и не несущими опухоль мышами, а также между C57BL6 и BALB/c мышами.

Кроме того, исследование PK/фармакодинамических (PD) параметров однократной дозы проводили при использовании антитела NKG2A.3 в модели CT26, где динамику изменения уровней лекарственных средств и занятость рецепторов (RO) определяли как в кровотоке, так и в опухолях. Среднее соотношение концентраций лекарственного средства в опухолях и в сыворотке крови составляло 0,10±0,07 (N=33), причем RO в крови и опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL) являлась полной при эффективной дозе у мышей, составляющей 1 мг/кг.

Пример 19. Фармакокинетические параметры антитела NKG2A.9 у яванских макаков

Авторы настоящего изобретения получали фармакокинетические характеристики антитела NKG2A.9 у яванских макаков в диапазоне доз от 0,5 мг до 50 мг/кг. PK параметры антитела NKG2A.9, полученные в результате токсикокинетического (TK)/PD исследования однократных доз и исследования переносимости однократных доз, кратко изложены в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры антитела NKG2A.9 после IV введения яванским макакам (среднее значение ± SD, N = 3)

Доза (мг/кг)	Cmax (нМ)	Tmax (часы)	AUC0-42сутки (мкМ × сутки)	T1/2 (сутки)	CLT (мл/сутки/кг)	Vss (мл/кг)
0,5	0,11±0,01	0,5±0*	1±0,2	14±6	3,1±0,9	53±7
10	2,5±0,29	0,5±0*	22±4	18±3**	2,4±0,5	57±6
50	9,8±2,5	0,5±0*	101±18	23±4	2,5±0,5	77±12

Примечание: PK параметры получали с применением анализа без компартментализации данных зависимости концентрации лекарственного средства в сыворотке крови от времени.
*момент первого забора образцов;
**две концентрации лекарственного средства, на которые оказывали воздействие ADA, не включали для расчета T1/2.

$AUC_{0\text{-}42сутки}$ являлась пропорциональной дозе при IV дозах от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг, причем период полувыведения находился в диапазоне от 14 суток до 23 суток. Кроме того, ADA оказывали воздействие на результаты PK только у одной обезьяны. Более того, моделирование PK/PD на основании данных RO в крови обезьян выявило, что EC_{50} лекарственного средства в сыворотке крови составляла 20±5,4 нМ, что согласуется с определенной *in vitro* EC_{50}, составляющей 31±5,4 нМ.

В заключение следует отметить, что исследования продемонстрировали, что антитело к NKG2A показывало хорошую занятость рецепторов и хорошо переносилось яванскими макаками.

Пример 20. Фармакокинетические параметры антитела NKG2A.9 у человека

Предполагают, что PK антитела NKG2A.9 у человека является такими же, как у обезьян. Вследствие этого прогнозируемая внутривенная доза у человека для антитела NKG2A.9 составляет 10 мг/кг, и прогнозируемый период полувыведения антитела NKG2A.9 у людей составляет 16 суток, как кратко изложено в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Прогнозируемые фармакокинетические параметры антитела NKG2A.9 у человека

IV доза (мг/кг)	AUCtot (мкМ × сутки)	T1/2 (сутки)	CLT (мл/сутки/кг)	Vss (мл/кг)
10	24	16	2,7	61

Пример 21. Проецирование эффективной дозы для человека

Эффективную дозу антитела NKG2A.9 для человека проецировали с применением подхода на основе RO. Оценивали доступные данные доклинических исследований *in vitro* и *in vivo*, включающие в себя RO у мышей и обезьян, а также противоопухолевую эффективность у мышей. Максимальная противоопухолевая эффективность в комбинации с антителом к mPD-1 демонстрировалась в изогенных моделях 1956 и CT26 при схеме дозирования, при которой 1 мг/кг вводили раз в трое-четверо суток в течение периода введения в общей сложности пяти доз (Q3/4D x5), без дальнейшего улучшения эффективности при дозах вплоть до 10 мг/кг. Важно, что в дозе 1 мг/кг рецепторы NKG2A как в крови, так и в опухолях (т.е. TIL) были полностью заняты, что указывает на полную RO. Кроме того, моделирование PK/PD на основании данных RO в крови обезьян выявило соответствие между EC_{50} для RO *in vitro* и *in vivo*, что говорит о том, что EC_{50} *in vitro* можно применять для прогнозирования RO *in vivo*. Зачастую эффективную дозу антитела NKG2A.9 для человека проецируют, нацеливаясь на 99% RO в крови при минимальной концентрации на спаде, с применением EC_{50} для RO у человека *in vitro*, составляющей 1 нМ Поскольку среднее соотношение концентраций в опухолях и в сыворотке крови, наблюдаемое в случае NKG2A.3 у мышей, составляло приблизительно 0,10 в сочетании с фактом, что подобное соотношение наблюдали в случае антитела к OX40 (BMS-986178) в образцах биоптатов опухолей человека, нацеливание на 99% RO в крови при максимальном спаде концентрации будет приводить к приблизительно 90% RO в опухолях в течение периода обработки. Следовательно, проецируемая эффективная доза для человека составляет 2,5 мг/кг при введении раз в четыре недели. При этой дозе прогнозируемые AUC и C_{trough} в равновесном состоянии у человека охватывают воздействие, достигаемое при максимальной эффективной дозе 1 мг/кг Q3/4Dx5 у мышей.

Пример 22. Стабильность и получение составов антитела NKG2A.9

Попытки получения составов показали, что платформенный подход к получению можно применять для разработки готового к применению (RTU) состава для антитела NKG2A.9. Предварительные оценки вязкости и стабильности в концентрации 150 мг/мл указывали на то, что антитело NKG2A.9 можно вводить посредством подкожного введения в условиях оптимизированного состава.

Оценку состава, включающую в себя исследование стабильности при замораживании-оттаивании и исследование стабильности в условиях ускоренной деградации, выполнили для антитела NKG2A.9 в концентрации 25 мг/мл, как кратко изложено в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Стабильность антитела NKG2A.9 в концентрации 25 мг/мл в составе-платформе

Свойство	Способ(способы)	Результаты
Замораживание/оттаивание (F/T) (1 час при -80°C, 1 час при комнатной температуре (RT) × 5)	UV, SEC	Не выявлен риск для стабильности при F/T
Профиль растворимости/концентрации	UV, SEC	По меньшей мере 25 мг/мл в буфере-платформе (20 мМ гистидин, pH 6,0, 260 мМ сахароза, 0,05 мМ DTPA, 0,05% полисорбат 80)
Стабильность в условиях ускоренной деградации 25 мг/мл 3 месяца при 4°C, 25°C и 40°C в составе-платформе.	UV, SEC, cIEF, пептидное картирование по результатам LC-MS/MS, функциональные анализы (проточная цитометрия)	3 месяца при 40°C = 5% повышение LMW* 3 месяца при 40°C = 4% повышение HMW* 3 месяца при 40°C = повышение на 12%/месяц в кислотном варианте 3 месяца при 40°C = 18% повышение дезамидирования по N326 в участке VSNK (SEQ ID NO: 162)

*LMW = низкая молекулярная масса, HMW = высокая молекулярная масса

Не наблюдали проблем с физической стабильностью во время стресса с замораживанием-оттаиванием (пять циклов) в концентрации 25 мг/мл в составе-платформе (20 мМ гистидиновый буфер с pH 6,0, 260 мМ сахароза, 50 мкМ диэтилентриаминпентауксусная кислота, 0,05% полисорбат 80). Исследования стабильности в условиях ускоренной деградации в буфере-платформе в концентрации 25 мг/мл проводили при температуре 4°C, 25°C и 40°C. За три месяца в исследуемых условиях незначительные химические модификации, которые не оказывали воздействие на функциональную активность, наблюдали в CDR участке антитела NKG2A.9. Эти незначительные химические модификации в антителе NKG2A.9 включали в себя изменения в окислении, дезамидировании и изомеризации аминокислотных остатков, которые ожидались вследствие хранения раствора, например, при повышенной температуре, и не оказывали отрицательное воздействие на активность связывания у антитела. Дезамидирование N326 в участке VSNK (SEQ ID NO: 162) Fc наблюдали в стрессовых условиях (приблизительно 18% после трех месяцев при 40°C), что является типичным для моноклональных антител IgG1. После хранения при 25°C в течение трех месяцев наблюдали дезамидирование, которое является приемлемым, с уровнем, составляющим приблизительно 1,4%. Не наблюдали проблем с физической стабильностью или потерей функциональной активности за три месяца в условиях исследования.

Не наблюдали проблем с вязкостью (кажущаяся вязкость = 7,3 сантипуаз (сП)) или агрегацией (0,4% растворимых агрегатов) при концентрации антитела NKG2A.9 до 150 мг/мл. Не наблюдали проблем с физической стабильностью во время стресса с замораживанием-оттаиванием (пять циклов) в концентрации 150 мг/мл в составе-платформе. Антитело NKG2A.9 в концентрации 150 мг/мл в составе-платформе подвергали исследованию стабильности в условиях ускоренной деградации в течение трех месяцев при температуре 4°C, 25°C и 40°C, как кратко изложено в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Стабильность антитела NKG2A.9 в концентрации 150 мг/мл в составе-платформе

Свойство	Способ(способы)	Результаты
Профиль растворимости/ концентрации	UV, SEC, вязкость (вискозиметр)	По меньшей мере 150 мг/мл в буфере-платформе (20 мМ гистидин, pH 6,0, 260 мМ сахароза, 0,05 мМ DTPA, 0,05% полисорбат 80) Кажущаяся вязкость = 7,3±0,1 сП
Стабильность в условиях ускоренной деградации 150 мг/мл 3 месяца при 4°C, 25°C и 40°C в составе-платформе	UV, SEC	3 месяца при 4°C = 0,1% повышение LMW 3 месяца при 4°C = 0,8% повышение HMW 1 месяц при 25°C = 0,4% повышение LMW 1 месяц при 25°C = 0,8% повышение HMW Значимую агрегацию и ухудшение наблюдали при 25°C и 40°C позже 1 месяца.

Незначительные проблемы с физической стабильностью наблюдали при температуре 4°C спустя три месяца, а при температуре 25°C - спустя один месяц исследования стабильности (0,8% повышение уровня агрегатов с высокой молекулярной массой, HMW, при обеих температурах). Ухудшение и физическую нестабильность наблюдали при повышенных температурах 25°C и 40°C после хранения в течение более чем одного месяца. Нестабильность, наблюдаемую после хранения в течение более продолжительного периода времени при повышенной температуре, вероятно, можно объяснить незначительной контаминацией изучаемой партии, применяемой для оценки.

Пример 23. Распределение в тканях антитела NKG2A.9

Иммуногистохимический анализ с применением антитела NKG2A.9 в панели из 20 замороженных тканей человека показал нерегулярную экспрессию в мононуклеарных клетках, но без неожиданного связывания. Присутствовало сильное окрашивание в небольших субпопуляциях мононуклеарных клеток, преимущественно, в селезенке, и редкое окрашивание мононуклеарных клеток в небных миндалинах, матке, желудке, тонком кишечнике, вилочковой железе и печени.

Пример 24. Исследование фармакокинетических параметров, токсикокинетических параметров, переносимости и фармакодинамических параметров однократной дозы NKG2A.9 у яванских макаков

Яванский макак является видом, используемым в доклинических токсикологических исследованиях, вследствие подобного связывания цельного антитела к NKG2A. Кроме того, результаты иммуногистохимического анализа тканей обезьян с применением антитела NKG2A.9 являются подобными таковым у людей, демонстрируя положительное окрашивание в малых субпопуляциях мононуклеарных клеток. Как обсуждается в настоящем документе, антитело NKG2A.9 связывается как с NKG2A, так и с NKG2C у обезьян, в то время как оно селективно связывается с NKG2A, но не с NKG2C у людей. Поскольку NKG2C представляет собой активирующий рецептор, возможно, что у обезьян может существовать одновременная повышающая регуляция иммунных ответов (вследствие блокады NKG2A) и понижающая регуляция иммунных ответов (вследствие блокады NKG2C).

Антитело NKG2A.9 вводили в виде однократной внутривенной дозы яванским макакам (n=3 на группу, обоих полов) в дозе 0 мг/кг, 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг и за животными наблюдали в течение 42 суток. Конечные показатели оценки в исследовании включали в себя клинические наблюдения, массу тела, клиническую лабораторную диагностику, фармакокинетические и токсикокинетические параметры, образование антител к лекарственному средству (ADA), RO, экспрессию NKG2A на поверхности и иммунофенотипирование PBMC. Всех животных иммунизировали белками Gag и Nef вируса иммунодефицита обезьян (SIV), экспрессируемыми с двух отдельных векторов на основе аденовируса-5, для оценки усиления иммунных ответов в качестве потенциального конечного показателя в PD ([тетрамерном] анализе SIV-реактивных Т-клеток в День 22; *ex vivo* Т-клеточный ответ на антиген в День 22. Это исследование не являлось окончательным, вскрытие или гистопатологические исследования не проводили.

Все дозы хорошо переносились в дозировках вплоть до 50 мг/кг ($AUC_{0\text{-}42сутки}$ ≤101 мкМ•сутки). Отсутствовали связанные с антителом NKG2A.9 клинические признаки, изменения массы тела или связанные с антителом NKG2A.9 изменения в гематологических или клинических биохимических анализах, как кратко изложено в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Краткое изложение результатов для антитела NKG2A.9: TK, переносимость и PD однократной IV дозы у обезьян
(n=3/группа)

Конечный показатель оценки в исследовании	**Результаты, связанные с антителом NKG2A.9**
Клинические признаки	Нет
Масса тела	Нет физических изменений
Гематология, клиническая биохимия	Нет физических изменений
Занятость рецептора	День 1, 4 часа: 81%, 99% и 100% для дозы 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно День 43: 36%, 84% и 97% для дозы 0,5 мг/кг,10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно
Уменьшение количества NKG2A на поверхности (маркер взаимодействия с мишенью)	День 1 (4 часа после введения дозы): экспрессия на поверхности составляла 50%, 52% и 58% (относительно уровня до введения дозы) для дозы 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг День 43: экспрессия на поверхности составляла 65-80%, 47-107% и 41-51% для дозы 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно
Ответ на иммунизацию	Нет изменения в анамнестической реакция *ex vivo* на Gag или Nef SIV. Выраженная опосредованная NKG2A.9 тенденция к снижению процентов Nef- и Gag-специфичных (тетрамер+) CD8+ клеток. В пределах популяций антигенспецифических CD8+ Т-клеток присутствовала выраженная тенденция к снижению процента T_{EM} клеток.
Токсикокинетические исследования	При дозе 50 мг/кг Cmax составляла 9,8 мкМ в День 1, через 0,5 часа, и $AUC_{0\text{-}42сутки}$ составляла 101 мкМ•сутки
Антитела к лекарственному средству (ADA)	ADA наблюдали у одного животного (10 мг/кг), начиная с первого момента времени, в День 8

ADA наблюдали у одного животного (10 мг/кг), начиная с первого момента времени, в День 8. Фармакокинетические/токсикокинетические параметры изменялись линейно в оцениваемом диапазоне доз. При высокой дозе 50 мг/кг Cmax составляла 9,8 мкМ (в День 1, через 0,5 часа), и $AUC_{0\text{-}42сутки}$ составляла 101 мкМ•сутки. Подводя итог, следует отметить, что исследование однократной дозы у обезьян показало RO, понижающую регуляцию

экспрессии NKG2A на поверхности как маркер взаимодействия с мишенью и приемлемые результаты ТК без каких-либо отрицательных результатов для однократной дозы, вводимой в дозировках до 50 мг/кг ($AUC_{0\text{-}42сутки}$ ≤101 мкМ•сутки).

Пример 25. Анализы высвобождения цитокинов

Анализ высвобождения цитокинов *in vitro* осуществляют с применением растворимого антитела NKG2A.9 и цельной крови от 15 людей-доноров. Цитокины и хемокины оценивали с помощью панели Luminex из 75 цитокинов/хемокинов для определения того, представляет ли обработка антителом NKG2A.9 риск для безопасности, заключающийся в синдроме высвобождения цитокинов. Не наблюдали связанную с NKG2A.9 индукцию анализируемых цитокинов или хемокинов человека.

Пример 26. Оценка риска иммуногенности для антител к NKG2A

Терапевтические антитела имеют потенциал вызывать иммунный ответ у пациентов против терапевтического антитела. Этот иммунный ответ обычно проявляется в виде образования антител к лекарственному средству (ADA), как например, вследствие ответа с выработкой человеческих антител к иммуноглобулину человека (HAHA), которые могут изменять воздействие, нейтрализовать терапевтическую функцию и/или даже приводить в результате к серьезным клиническим последствиям для пациента. Полагают, что «чужеродность» терапевтического антитела, которое распознается иммунной системой как «не-свое», является основным фактором опосредованного MHC класса II иммунного ответа с выработкой ADA. В случае безопасного и эффективного антитела к NKG2A, которое описано в настоящем документе, важно иметь низкую иммуногенность или не иметь иммуногенности. Потенциал к иммуногенности у человека для нескольких моноклональных антител к NKG2A оценивали *in silico* с помощью инструментов для изучения связывания с HLA и *in vitro* с помощью анализов пролиферации DC:T-клеток. Как обсуждалось в настоящем документе, антитело NKG2A.9 подвергали воздействию методов генной инженерии для того, чтобы оно имело особенности в виде низкой иммуногенности у человека, что оценивали *in silico* с помощью инструментов для анализа связывания с HLA. Риск для различных антител к NKG2A (антитела NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11) в отношении того, что они вызывают нежелательный иммунный ответ на антитела у людей определяли как низкий, исходя из анализов пролиферации DC:T-клеток *in vitro*.

1. Анализ связывания с HLA *in silico* применяли для конструирования антител к NKG2A с низким риском иммуногенности

Активация и пролиферация Т-клеток являются необходимыми стадиями для развития иммунного ответа. В частности, связывание пептидного антигена с HLA класса II является критическим этапом в развитии иммунного ответа, опосредуемого

высокоаффинным антителом IgG. При применении инструмента для анализа связывания с HLA (IEDB) *in silico* (*см.*, *например*, Wang P, et al., PLoS Comput Biol.4(4) (2008)), авторы настоящего изобретения анализировали участки CDR моноклональных антител посредством деления аминокислотной последовательности на 15 перекрывающихся пептидов и ранжирования по связыванию с 27 аллелями HLA DRB1 (что охватывает приблизительно 95% человеческой популяции) относительно всех других пептидов, представленных в базе данных IEDB. Пептиды, ранг которых попадал в верхний 10 процентиль для заданного аллеля HLA, считают «связывающим элементом», а участок, который демонстрирует свойства связывающего элемента для 50% аллелей, обозначен как «связывающий кластер». «Связывающий элемент» или «связывающие кластеры» в биологической молекуле считают движущим фактором в проявлении иммуногенности (Sinu, P et al., *Clinical & Developmental Immunology* Vol. 2013 (2013)).

Как показано на фиг. 54A, антитело 13F3.A4 содержит два HLA связывающих кластера; несколько пептидов, охватывающих участок CDR2 VH и участок CDR2 VL, согласно прогнозу связываются с до 70% или с 19/27 аллелей HLA класса II DRB1 (которые обозначены заштрихованными цифрами под последовательностью на фиг. 54A). Как обсуждалось в настоящем документе, «связывающий кластер» представляет собой участок, который демонстрирует свойства связывающего элемента для 50% аллелей; заштрихованная цифра 6 означает, что 60% аллелей демонстрируют связывание и, таким образом, представляют собой «связывающий кластер».

Кроме того, как показано на фиг. 54B и описано в настоящем документе, возвратная мутация VH-I107T в каркасном участке (то есть замена изолейцина на треонин в положении 107) удаляла связывающий кластер из антитела 13F3.A4. Выбирали эту замену I107T в антителе 13F3.A4, как например, изолейцин в положении 107 выбирали в антителе NKG2A.9 (T в положении 107 показана стрелкой во второй строке на фиг. 54B).

Как показано на фиг. 54C и описано в настоящем документе, для конструирования и сведения к минимуму потенциала имуногенности у антитела 13F3.A4 в CDR1 легкой цепи антитела 13F3.A4 аспарагин (N) в 30 положении (вторая строка на фиг. 54C) меняли при использовании методов генной инженерии на пролин (P) (вторая строка на фиг. 54c), глутамин (Q) (третья строка на фиг. 54C) или серин (S) (четвертая строка на фиг. 54C). Замену N30S (которая показана на четвертой строке на фиг. 54C) выбирали, поскольку она не демонстрировала потенциал к связыванию с HLA (что указано цифрой «0» в заштрихованном участке). Эту замену N30S в антителе 13F3.A4 (N в положении 30) выбрали для включения в антитело NKG2A.9 (S в положении 30). На фиг. 54B-C с целью упрощения показаны только определенные положения в последовательностях 13F3.A4.

2. Риск иммуногенности у антител к NKG2A (NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11) являлся низким на основании результатов анализов пролиферации DC:Т-клеток *in vitro*

После того как молекула HLA класса II связывается с пептидным антигеном, следующим критическим этапом в развитии иммунного ответа на терапевтическое антитело является активация CD4+ Т-клеток. Эта активация Т-клеток происходит в результате распознавания комплекса когнатный пептид-MHC (HLA) на антигенпрезентирующих клетках. Активация и пролиферация Т-клеток (помимо множества других факторов) требуются для развития иммунного ответа. *In vitro* анализы прогнозирования иммуногенности на основе мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) при использовании различных наборов доноров применяют для определения того, является ли молекула потенциально иммуногенной, на основании ее способности стимулировать эти специфические активированные CD4+ Т-клетки *ex vivo*.

Анализ пролиферации DC:Т-клеток *in vitro* (*см.*, *например*, способы, описанные в Joubert MK, et al., PLOS ONE 11(8) (2016)), проводили для нескольких антител к человеческому NKG2A (антитела NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11) с целью дополнительной оценки потенциала иммуногенности у человека для этих антител. Кратко, PBMC от здоровых добровольцев выделяли в градиенте плотности фиколла (GE Healthcare). Проводили центрифугирование в градиенте плотности и человеческий лимфоцитарный антиген (HLA) класса II характеризовали с применением амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации с олигонуклеотидными зондами (ProImmune). Панель PBMC от 40 доноров состояла из типов HLA класса II, точно соответствующих частотам в человеческой популяции во всемирном масштабе, и ее применяли для проведения анализа.

Моноциты, выделенные из PBMC с применением способа на основе отрицательной селекции на гранулах (Intellicyt), культивировали в среде DC (Lonza), содержащей Il-4 и GM-CSF, для получения незрелых дендритных клеток (DC), их подвергали импульсному воздействию антител к человеческому NKG2A (антител NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11) и белков для контроля качества в течение четырех часов с последующей стадией созревания DC в течение двух суток в среде, содержащей TNF-a, IL-1b, IL-6 и PGE2.

Подвергнутые импульсному воздействию DC добавляли к аутологичным PBMC, меченым сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) (Invitrogen) для мониторинга пролиферации, и высевали в 96-луночные планшеты в шести параллелях в количестве 200000 клеток на лунку в среде DC (Lonzo), содержащей пенициллин-стрептомицин (Gibco), в течение семи суток, после чего среду выливали и клетки метили моноклональными антителами APC к человеческому CD4 (BD Biosciences). После удаления

не связавшихся с моноклональным антителом к CD4 клеток со стадией отмывки клетки фиксировали с использованием 3,7% формалина (Sigma) в PBS, анализировали с помощью проточной цитометрии для определения процента пролиферирующих CD4+ Т-клеток.

Как показано на фиг. 55, NKG2A.9 обеспечивало ответ в виде пролиферации CD4+ Т-клеток по сравнению с подвергнутыми импульсному воздействию среды дендритными клетками только у трех из 40 доноров (7,5%) в этом анализе DC:Т-клеток *in vitro*. Этот результат являлся сравнимым с 12,5% пролиферацией CD4+ для контрольного моноклонального антитела (бевацизумаба), которое, как было продемонстрировано, имеет очень низкую иммуногенность при клиническом применении («контроль с низкой иммуногенностью») (Saffari F., et al., *Int J Cancer Manag.*; 11(11)(2018)). Антитело «контроля с высокой иммуногенностью» (ATR-107) демонстрировало пролиферацию CD4+ у 70% доноров и, как было показано, имело высокий показатель ADA, составляющий 76%, в клинических исследованиях (Hua, F., et al., *The Journal of Clinical Pharmacology*, 54: 14-22 (2014)).

NKG2A.11 также обеспечивало ответ в виде пролиферации CD4+ только у 3 из 40 доноров. Антитело NKG2A.6 не обеспечивало ответ в виде пролиферации CD4+ ни у одного донора. Данные воспроизводимости результатов для контрольных антител с высокой и низкой иммуногенностью для этого анализа демонстрируют коэффициент вариации в % (CV%), составляющий 5-10%. Таким образом, ни одно из этих моноклональных антител не отличалось значимо своим низким риском иммуногенности. Подводя итог, риск того, что антитела NKG2A.6, NKG2A.9 и NKG2A.11 вызывают нежелательный иммунный ответ на антитела у людей, определяли как низкий, исходя из анализов пролиферации DC:Т-клеток *in vitro*.

Пример 27. Исследование токсикокинетических параметров, переносимости и фармакодинамических параметров однократной внутривенной дозы у обезьян

Антитело NKG2A.9 хорошо переносилось, когда его вводили внутривенно в виде однократной дозы яванским макакам в дозе 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг ($AUC_{0\text{-}42сутки}$ ≤101 мкМ•сутки), и никаких аномалий не идентифицировали с помощью клинической лабораторной диагностики.

В частности, это исследование проводили для определения возможной токсичности антитела NKG2A.9, когда его вводили внутривенно в виде однократной дозы обезьянам (1) для определения системного воздействия на NKG2A.9 и (2) для оценки фармакодинамического ответа на NKG2A.9 после иммунизации векторами на основе аденовируса серотипа 5 (Ad5), экспрессирующими белки gag и nef вируса иммунодефицита обезьян (Ad5-gag и Ad5-nef, соответственно). Антитело NKG2A.9 вводили внутривенно в

виде медленной струйной инъекции в дозах 0 мг/кг (среда), 0,5 мг/кг, 10 мг/кг или 50 мг/кг группам из трех не подвергавшихся воздействию белка обезьян (1 или 2 одного пола). Дозы вводили в объеме 0,25 мл/кг, 0,5 мл/кг или 2,5 мл/кг в среде/носителе с 20 мМ гистидином, 260 мМ сахарозой, pH 6,0. 2 вектора на основе Ad5 вводили внутримышечно в заднюю часть четырехглавой мышцы бедра или в задние мышцы бедра 1 инъекцией примерно с 3,3 □10^9 вирусных частиц в объеме 0,5 мл. Критерии оценки включали в себя выживаемость, токсикокинетические параметры, клинические наблюдения, массы тела, результаты клинической лабораторной диагностики и оценки иммунотоксикологических и фармакодинамических параметров (антитела к лекарственному средству, фенотипирование лимфоцитов периферической крови, активация натуральных киллеров и Т-клеток, анамнестические реакции на Nef и Gag ex vivo, фенотипирование антигенспецифических Т-клеток, а также занятость рецептора NKG2A и экспрессия рецептора). За обезьянами вели наблюдение в течение шестинедельного периода после введения дозы, после чего их возвращали в место содержания.

Воздействия в виде AUC(0-T) и Cmax для антитела NKG2A.9 повышались пропорционально дозе при оцениваемых уровнях дозы. После внутривенного введения системные воздействия у самцов являлись сравнимыми с таковыми у самок при всех уровнях дозы. Поскольку отсутствовали значимые различия между полами в значениях системного воздействия, все результаты и выводы основывались на объединенных данных от обоих полов. У одной из девяти обезьян, которым вводили антитело NKG2A.9 в дозе 10 мг/кг, проявлялись антитела к лекарственному средству, и та же обезьяна под воздействием антител к лекарственному средству демонстрировала более быстрое снижение концентраций лекарственного средства по сравнению с другими обезьянами.

Краткое изложение токсикокинетических параметров для антитела NKG2A.9 представлено ниже:

Краткое изложение токсикокинетических параметров - средние значения, объединенные для обоих полов

Параметр	**Доза антитела NKG2A.9**		
	0,5 мг/кг	**10 мг/кг**	**50 мг/кг**
Cmax; мкг/мл	16,8	380	1470
AUC(0-1008 ч.);	3620	79000	365000

Все животные выживали, и их возвращали в место содержания в конце исследования. Антитело NGK2A.9 хорошо переносилось во всех дозах, не оказывая воздействия на клинические наблюдения, массу тела или данные клинической

лабораторной диагностики. Отсутствовали опосредованные NKG2A.9 изменения в процентах Т-клеток периферической крови, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, активированных CD4+, CD8+, эффекторных CD8+ Т-клеток памяти или обогащенных NK-клетками лимфоцитов. Также не изменялись анамнестические реакции на пептиды gag и nef *ex vivo*. Проценты антиген-специфических CD8+ Т-клеток не изменялись, несмотря на то, что присутствовала высокая вариабельность во всех дозах.

Через четыре часа после введения дозы в День 1 среднее значение занятости рецептора NKG2A для группы на обогащенных NK-клетками лимфоцитов составляло 81%, 99% и 100% относительно предварительного анализа при дозах NKG2A.9 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно. Ко Дню 43 для обезьян, которым вводили дозы 0,5 мг/кг NKG2A.9, занятость рецептора снижалась до диапазона от 21% до 45%; для обезьян, которым вводили дозы с 10 мг/кг NKG2A.9, занятость рецептора снижалась до диапазона от 72% до 95%. Через 4 часа после введения дозы в День 1 среднее значение экспрессии рецептора NKG2A для группы на обогащенных NK-клетками лимфоцитов составляло 50%, 52% и 58% относительно предварительного анализа при дозах NKG2A.9 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно, что демонстрировало интернализацию или понижающую регуляцию рецептора после введения дозы NKG2A.9. Ко Дню 43 экспрессия рецептора NKG2A находилась в диапазоне от 65% до 80%, от 47% до 99% и от 41% до 46% при дозе антитела NKG2A.9 0,5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно.

В заключение стоит отметить, что антитело NKG2A.9 хорошо переносилось обезьянами после однократного внутривенного введения в дозе ≤50 мг/кг (среднее значение, объединенное для обоих полов, AUC[0-1008 ч.] ≤365000 мкг•час/мл). Занятость рецептора и пониженную экспрессию рецептора наблюдали во всех исследуемых дозах.

Пример 28. Одномесячное исследование токсичности при периодическом подкожном и внутривенном введении доз у яванских макаков

Одномесячное исследование проводили с целью определения потенциальной токсичности антитела NKG2A.9 при введении яванским макакам один раз в неделю в течение одного месяца (1) для оценки потенциальной обратимости любых результатов, (2) для определения системного воздействия на NKG2A.9 и (3) для обеспечения данных для обоснования применения NKG2A.9 у людей. NKG2A.9 вводили посредством подкожной инъекции в дозах 0 мг/кг (среда), 10 мг/кг или 100 мг/кг трем группам из пяти обезьян/пол/группа. Составы для подкожных доз 10 мг/кг или 100 мг/кг NKG2A.9 включали в себя 2000 Ед./мл rHuPH20. Кроме того, NKG2A.9 вводили посредством внутривенной инъекции (медленная струйная) в дозе 1 мг/кг одной группе из пяти

обезьян/пол. Все дозы вводили в объеме 2 мл/кг в среде с 20 мМ гистидином, 250 мМ сахарозой, 0,05 нМ диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DTPA) и 0,05% (масса/объем) полисорбатом-80 (PS-80), pH 6.

Критерии для оценки включали в себя выживаемость, токсикокинетические параметры, клинические наблюдения, массы тела, визуальные оценки потребления корма, физический осмотр (в том числе оценку дыхательной и нервной системы) и офтальмологический осмотр, оценку клинической лабораторной диагностики, иммунофенотипирование, активацию клеток-натуральных киллеров (NK), экспрессию рецептора (RE), занятость рецептора (RO), массы органов, а также анализы макро- и микроскопических патологий. Запланированные вскрытия проводили спустя 1 месяц еженедельного введения доз: в общей сложности 5 доз - (3/пол/группа) и после 8-недельного периода восстановления (2/пол/группа).

В День 22 средние значения системного воздействия NKG2A.9 (AUC[0-168h]) повышались пропорционально дозе от 10 мг/кг до 100 мг/кг. Отсутствовали значимые различия между полами при любой дозе. Накопление NKG2A.9 наблюдали после повторяющегося введения при всех уровнях дозы со средними значениями системного воздействия (AUC[0-168 ч.]), которые примерно 2,5-2,9-кратно превышали таковые в День 1. Присутствие возникающих за время обработки антител к лекарственному средству/NKG2A.9 выявляли у 1 из 10, 2 из 10 и 3 из 10 обезьян при дозе 1 мг/кг (внутривенное), 10 мг/кг (подкожное) или 100 мг/кг (подкожное), соответственно, в День 8 и/или после Дня 8; они не оказывали значимое воздействие на средние значения системных воздействий для NKG2A.9.

Краткое изложение токсиконетических параметров для антитела NKG2A.9 представлено в следующей таблице:

Параметр [a]	**Период**	**Доза NKG2A.9**		
		1 мг/кг	**10 мг/кг**	**100 мг/кг**
		(внутривенная)	**(подкожная с 2000 Ед./мл rHuPH20)**	**(подкожная с 2000 Ед./мл rHuPH20)**
Cmax (мкг/мл)	День 1	29,4	143	1270
	День 22	49,3/49,9	416/372	3120/3100
AUC(0-168часов) (мкг•час/мл)	День 1	1960	19200	170000
	День 22	4820/4850	55500/52700	425000/424000

a Значения рассчитывали с использованием данных от всех доступных обезьян/только от обезьян без выявляемых
возникающих за время обработки антител (ADA) к NKG2A.9, которые выявляли в День 8 и/или после Дня 8 (т.е. через 168 часов после введения доз в День 1).

Отсутствовала связанная с NKG2A.9 смертность; все обезьяны дожили до запланированного вскрытия. NKG2A.9 хорошо переносилось при всех дозах, не оказывая воздействия на клинические наблюдения, массу тела, визуальные оценки потребления корма, параметры сердечно-сосудистой системы, нервной системы, офтальмологической оценки, клинической лабораторной диагностики или гистопатологической оценки.

Отсутствовали связанные с NKG2A.9 изменения в количествах Т-клеток (общие Т-клетки, Т-хелперы или цитотоксические Т-клетки), В-клеток или NK-клеток или активация обогащенных NK-клетками популяций клеток периферической крови.

Наблюдали дозозависимую занятость рецептора (RO) на NK-клетках (84%, 95% и 100% при дозах NKG2A.9 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно) через четыре часа после первой дозы. После этого во все моменты времени до Дня 29 диапазон средних значений RO в группе составлял от 72% до 84% и от 94% до 98% при дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно, с максимальной (100%) RO при дозе 100 мг/кг. Несмотря на то, что RO являлась полной и устойчивой в течение фазы восстановления (в период до Дня) при дозе 100 мг/кг, частичную потерю RO наблюдали при дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг. При дозе 1 мг/кг частичную потерю RO наблюдали с Дня 71 по День 85 (среднее значение RO в группе 39%), что коррелировало с падением концентраций NKG2A.9 в сыворотке крови ниже 4 мкг/мл. При дозе 10 мг/кг частичную потерю занятости наблюдали в День 85 (среднее значение RO в группе 74%), что коррелировало падением концентраций NKG2A.9 в сыворотке крови ниже 50 мкг/мл.

Известно, что взаимодействие NKG2A.9 с NKG2 приводит в результате к частичной понижающей регуляции как следствие интернализации рецептора. Присутствовало независимое от дозы снижение RE NKG2 на NK-клетках во время фазы введения доз (общий диапазон 36-75% относительно значений в предварительном анализе для всех доз) с минимальным восстановлением во время фазы восстановления при дозе 1 мг/кг и без восстановления при дозе 10 мг/кг или 100 мг/кг.

Подводя итоги, следует отметить, что NKG2A.9 хорошо переносилось яванскими макаками в течение одного месяца на уровне ≤100 мг/кг/неделя (среднее значение AUC ≤425000 мкг·час/мл), что доказывает устойчивое взаимодействие с мишенью во всех дозах. Опосредованная NKG2A.9 блокада взаимодействия NKG2A/HLA-E в NK-клетках к яванских макаков *in vivo* не индуцировала активацию иммунных клеток, что говорит об отсутствии или минимальном вкладе пути NKG2A в случае физиологических условий в отсутствие заболевания. Исходя из переносимости и отсутствия свидетельствующих о патологии анатомических данных или результатов клинической лабораторной диагностики, считали, что максимальная доза препарата, не приводящая к развитию наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL) составляет 100 мг/кг, причем она также считается наиболее высокой дозой, не оказывающей тяжелого токсического воздействия на организм (HNSTD).

Пример 29. Иммуногистохимический анализ экспрессии NKG2A в опухолях

Авторы настоящего изобретения полагают, что активность антитела NKG2A.9 снижает ингибирующую активность NKG2A и приводит к усиленной цитотоксичности в месте, где находится опухоль. Следовательно, критерии для определения приоритета в отношении опухолей включают в себя экспрессию NKG2A и HLA-E.

Для идентификации возможных показаний для опухолей предварительное определение профиля NKG2A в выбранных типах опухолей оценивали с использованием конъюгированного с FITC NKG2A.6 (исходный клон антитела NKG2A.9) на замороженных срезах. NKG2A присутствовал в небольшой фракции мононуклеарных клеток и преимущественно распределялся в строме опухоли, как показано на фиг. 45. На фиг. 45 представлены типичные примеры окрашивания NKG2A в приобретенных у коммерческих поставщиков образцов опухолей, окрашенных конъюгированным с FITC антителом NKG2A.6 и реактивом отрицательного контроля (KLH антитело к человеческому IgG1.1-FITC). На фиг. 45, «шейка матки» означает карциному шейки матки; «голова и шея» означает плоскоклеточную карциному головы и шеи; «мочевой пузырь» означает карциному мочевого пузыря; и NSCLC-Adc означает немелкоклеточный рак легкого,

аденокарцинома. «St» представляет собой строму опухоли, и «TuEp» представляют собой эпителиальные клетки опухоли.

Проводили анализ изображений экспрессии NKG2A с помощью иммуногистохимии на замороженных срезах опухолей. Анализ «горячих точек» на изображении с применением программного обеспечения HALO™ осуществляли на трех зонах на образец. Окрашивание изотипическим контролем вычитали из окрашивания конъюгированным с FITC антителом NKG2A.6. Этот анализ изображения выявил относительно высокую распространенность экспрессии NKG2A в карциномах шейки матки и карциномах головы и шеи, умеренную экспрессию в карциномах мочевого пузыря и немелкоклеточных карциномах легкого и низкую экспрессию в карциномах поджелудочной железы и карциномах толстой и прямой кишки, как показано на фиг. 46. На фиг. 46 представлены уровни экспрессии NKG2A в различных типах опухолей. На оси Y представлено количество положительных клеток на зону площадью 1,15 мм^2, и результаты представлены в виде средних значений плюс среднеквадратичная ошибка.

Пример 30. Иммуногистохимический анализ экспрессии HLA-E в 7 типах опухолей

Для оценки экспрессии HLA-E коммерческое антитело к HLA-E (клон MEM-E/02) валидировали для иммуногистохимического окрашивания зафиксированных формалином залитых в парафин (FFPE) тканей. HLA-E широко экспрессировался в оцениваемых образцах опухолей. Положительное окрашивание наблюдали как в эпителии, так и в строме опухолей. Анализ изображения всего среза с применением программного обеспечения HALO™ выявил относительно более высокую распространенность HLA-E в HNSCC и NSCLC и более низкую распространенность в карциноме поджелудочной железы и злокачественной опухоли ободочной и прямой кишки (CRC), как показано на фиг. 47. На фиг. 47 представлены результаты анализа изображения всего среза в отношении экспрессии HLA-E с применением программного обеспечения HALO в 13 образцах HPV+ плоскоклеточной карциномы головы и шеи (NNSCC/HPV+), 11 образцах HPV- плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC/HPV-), 10 образцах немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLC-ADC), 10 образцах HNSCC, 10 образцах немелкоклеточной плоскоклеточной карциномы легкого (NSCLC-SCC), 6 образцах карциномы поджелудочной железы и 10 образцах карциномы толстой кишки (CRC). Иммунореактивность HLA-E рассчитывали следующим образом: общая площадь «коричневой области» × средняя OD «коричневой области» / общая площадь ткани. Данные нормализовали к мм^2. Результаты представлены в виде средних значений плюс среднеквадратичная ошибка.

В эпителиальных клетках опухоли положительное окрашивание преимущественно локализовалось в цитоплазме. Заметное окрашивание мембран также демонстрировалось в некоторых опухолевых клетках. В строме опухоли положительное окрашивание преимущественно распределялось в мононуклеарных клетках и субпопуляциях интерстициоцитов, а также иногда в микроциркуляторном русле и нейтрофилах в некоторых случаях. В целом, экспрессия HLA-E в строме присутствовала почти во всех случаях. Тем не менее, экспрессия в эпителиальных клетках опухоли значительно варьировала от образца к образцу во всех оцениваемых типах опухолей. Высокий уровень экспрессии в эпителии опухоли наблюдали в большинстве случаев, тогда как отрицательную или очень низкую экспрессию наблюдали в небольшом числе случаев, как показано на фиг. 48. На фиг. 48 «St» представляет собой строму опухоли, и «TuEp» представляют собой эпителиальные клетки опухоли. На фиг. 48 представлены иллюстративные изображения экспрессии HLA-E в нескольких опухолях. Иммуногистохимический анализ проводили с использованием валидированного коммерческого моноклонального антитела на FFPE срезах от HPV+ плоскоклеточной карциномы головы и шеи (NNSCC/HPV+), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLC-ADC), немелкоклеточной плоскоклеточной карциномы (NSCLC-SCC) и карциномы толстой кишки (CRC).

Пациенты с опухолями, являющимися следствием вируса. Вирусные инфекции могут индуцировать экспрессию NKG2A на NK клетках, как наблюдали у пациентов с хронической инфекцией гепатитом C. (Harrison RJ et al., “Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection.” *Clin Exp Immuno* 161:306-14 (2010)). Кроме того, показано, что частота NKG2A+ CD8 T-клеток является более высокой в TIL от пациентов с HPV-16+ карциномами головы и шеи по сравнению с опухолями, вызванными HPV-16. (van Hall T, et al. “NKG2A checkpoint receptor expression on tumor-infiltrating CD8+ T cells restrains efficacy of immunotherapy.” *Cancer Res Supplement*; Abstract 2999 (2017)). Авторы настоящего изобретения оценивали связь между статусом в отношении HPV у опухолей головы и шеи и экспрессией пути NKG2A/HLA-E с помощью измерения экспрессии HLA-E в биоптатах из HPV+ и HPV- опухолей головы и шеи посредством IHC. Первоначальная оценка авторами настоящего изобретения на относительно небольшом количестве образцов показала, что экспрессия HLA-E по результатам IHC не отличалась значимо между HPV+ и HPV- образцами, как показано на фиг. 48. Авторы настоящего изобретения будут исследовать HPV-статус у опухолей головы и шеи и экспрессию пути NKG2A/HLA-E посредством измерения с помощью IHC экспрессии CD8 (в качестве заменителя для экспрессии NKG2A) и HLA-E в биоптатах из HPV+ и HPV- опухолей

головы и шеи. Авторы настоящего изобретения также продолжили IHC анализ с использованием дополнительных типов опухолей и более крупных размеров выборок, и этот анализ описан в примере 31 ниже.

Пример 31. Иммуногистохимический анализ экспрессии HLA-E в 17 типах опухолей

Авторы настоящего изобретения определяли профиль экспрессии HLA-E в 17 типах опухолей с помощью иммуногистохимической (IHC) оценки. Авторы настоящего изобретения полагают, что пациенты с раком, наиболее вероятно, ответят на противоопухолевое лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе, в отношении типов опухолей, которые экспрессируют повышенные уровни HLA-E.

Для оценки экспрессии HLA-E иммуногистохимический анализ (IHC) проводили на зафиксированных формалином залитых в парафин (FFPE) срезах из 17 типов/подтипов опухолей, в том числе аденокарциномы (CRC) шейки матки, мочевого пузыря, молочной железы, ободочной и прямой кишки, плоскоклеточной карциномы (HNSCC) эндометрия, головы и шеи, злокачественной опухоли желудка, глиобластомы (GBM), меланомы, неходжкинской лимфомы (фолликулярной лимфомы), злокачественной опухоли яичника, почечно-клеточной злокачественной опухоли (RCC), злокачественной опухоли поджелудочной железы, предстательной железы, мелкоклеточной карциномы легкого (SCLC), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLC-AD) и немелкоклеточной плоскоклеточной карциномы легкого (NSCLC-SQC), с использованием хорошо охарактеризованного коммерческого моноклонального антитела (клон MEM/02). Присутствовало от 14 до 43 образцов на тип/подтип опухоли. Окрашенные микроскопические препараты оценивались обученными патоморфологами для идентификации ткани или типа клеток. Все срезы оценивали в отношении соответствия элементов ткани и окрашивания. Традиционную/ручную оценку выполняли обученные патоморфологи.

Результаты продемонстрировали, что экспрессию HLA-E наблюдали в компартментах опухолевых клеток, иммунных и эндотелиальных клеток при различных показаниях. В опухолевых клетках положительное окрашивание преимущественно локализовалось в цитоплазме во всех типах человеческих опухолей с отмеченной ограниченной экспрессией на поверхности плазматической мембраны. Общая экспрессия HLA-E варьировала от диффузного расположения положительных опухолевых клеток до неоднородной экспрессии в некоторых случаях с низкой-почти отсутствующей экспрессией HLA-E. На фиг. 57 представлена диаграмма «ящик с усами» общей оценки положительного

окрашивания в отношении HLA-E у 17 различных типов опухолей, которые оценивали с помощью иммуногистохимии. Общая оценка HLA-E определена как процент объединенных результатов положительного окрашивания в отношении HLA-E в цитоплазме и/или мембране в опухолевых клетках. Данные, которые использовали для создания фиг. 57, представлены в таблице ниже.

Тип опухоли	Образцы (N)	Общая оценка HLA-E положительных опухолей[1]	Общий процент HLA-E положительных опухолей[2]	Среднее значение	Медианное значение	Стандартное отклонение	25й процентиль	75й процентиль
Рак мочевого пузыря	20	17	85%	37,3	40,0	30,4	11,5	52,5
Рак молочной железы	20	14	70%	16,3	7,5	22,9	0	21,25
Мультиформная глиобластома	19	16	84,21%	9,9	5,0	15,1	2	10
Рак желудка	20	17	85%	32,7	15,0	36,4	2,75	58,75
Рак почки, светлоклеточный почечно-клеточный	20	15	75%	20,4	9,0	23,4	1,5	37,5
NSCLC-AD	40	38	95%	35,8	25,0	33,6	6	61,25
NSCLC-SCC	40	37	92,50%	39,1	30,0	32,0	10	65
Меланома	20	18	90%	32,0	10,0	35,0	1,88	62,5
Рак эндометрия	20	19	95%	27,3	12,5	31,9	3	41,25
Рак яичника	20	20	100%	25,0	16,5	25,0	9,88	25
CRC	39	38	97,44%	30,2	20,0	28,7	8	47,5
NHL, фолликулярная лимфома	20	20	100%	58,3	61,3	26,3	32,38	77,5
HNSCC	40	39	97,50%	48,7	46,5	30,9	19	76,25
Рак предстательной железы	20	20	100%	5,4	4,5	4,4	2,38	5,5
Рак шейки матки	20	20	100%	54,7	62,5	27,2	28,75	75

Рак поджелудочной железы	43	41	95,35%	44,1	42,5	33,7	10	72,5
SCLC	14	9	64,29%	14,9	4,5	20,6	0	23,75

[1] Для расчета «общей оценки положительных в отношении HLA-E опухолей» использовали 1% пороговое значения для значений HLA-E. Иначе говоря, если более чем 1% опухолей или количество, равное 1% опухолей, являлись положительными в отношении HLA-E (цитоплазматический и/или мембранный HLA-E), то образец помечали как «положительный».

[2] «Общий процент положительных в отношении HLA-E опухолей» представляет собой процент положительных в отношении HLA-E пациентов с данном типом опухолей.

На фиг. 57 каждый из «ящиков» на диаграммах «ящик с усами» показывают общее значение для опухолей, положительных в отношении HLA-E, на 25ом процентиле; средняя линия в каждом из «ящиков» представляет собой медианное значение; и верхний предел в каждом из «ящиков» показывает значение на 75ом процентиле.

В заключение стоит отметить, что присутствовал диапазон динамического изменения общей экспрессии HLA-E между группами показаний для опухолей и в пределах группы показаний для опухолей. Авторы настоящего изобретения полагают, что пациенты с раком, имеющие высокую экспрессию HLA-E в опухолевых клетках, с большей вероятностью отвечают на противоопухолевое лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе. Неходжкинская лимфома (фолликулярная лимфома), опухоль шейки матки, HNSCC, опухоль поджелудочной железы, NSCLC и опухоль мочевого пузыря имели наивысший уровень общей экспрессии HLA-E; таким образом, пациенты с этими формами рака имеют наивысшую вероятность ответа на противоопухолевое лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе. Это исследование обеспечивало данные для получения профиля для обоснования определения приоритета в выборе показаний для включения, например, злокачественных опухолей HNSCC, RCC, NSCLC и CRC, в клиническую разработку.

Злокачественная опухоль предстательной железы, GBM и SCLC демонстрировали самый низкий уровень экспрессии HLA-E. Тем не менее, авторы настоящего изобретения полагают, что пациенты с типами опухолей, которые имеют более низкую экспрессию HLA-E, также будут отвечать на противоопухолевое лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе. Это исследование более подробно описано ниже.

Материалы и методы

Образцы тканей

Исследовали в общей сложности 17 типов/подтипов рака из двух наборов образцов. Исследовали полноразмерные FFPE микроскопические препараты 6 типов/подтипов опухолей, в том числе аденокарциномы ободочной и прямой кишки (CRC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLC-AD), немелкоклеточной плоскоклеточной карциномы легкого (NSCLC-SQC), карциномы поджелудочной железы и мелкоклеточной карциномы легкого (SCLC), с 14-24 образцами на тип опухоли. FFPE образцы тканей получали от различных коммерческих поставщиков ткани (BioIVT, Детройт, Мичиган, США; BioChain Institute Inc. Ньюарк, Калифорния, США; Conversant Biologics Inc, Хантсвилл, Алабама, США; Cooperative Human Tissue Network, Филадельфия, Пенсильвания, США; Indivumed GmbH,

Льюисберг, Пенсильвания, США; The MT Group Inc. Ван-Найс, Калифорния, США; TriStar Technology Group LLC, Роквилл, Мэриленд, США). Кроме того, изучали многоопухолевые блоки (MTB), содержащие 16 типов/подтипов опухолей, в том числе злокачественных опухолей мочевого пузыря, молочной железы, GBM, желудка, RCC, NSCLC-AD, NSCLC-SQC, меланомы, эндометрия, яичника, CRC, HNSCC, предстательной железы, шейки матки, карциномы поджелудочной железы и неходжкинской лимфомы (фолликулярной лимфомы), с 20 случаями/типами опухолей. Каждый MTB содержал 5 случаев с одним показанием на FFPE блок и 1 гиперпластическую небную миндалину в качестве положительного контроля. MTB были изготовлены Folio Biosciences (сейчас Discovery Life Sciences) для BMS.

Антитела и реактивы

- Мышиное моноклональное антитело к человеческому HLA-E, клон MEM/02 (Abcam, Кембридж, Массачусетс, США, номер в каталоге ab2216, лот GR251472-15)
- Изотипический контроль в виде мышиного IgG1, клон 11711 (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США, номер в каталоге MAB002, лот IX2415091)
- Набор реактивов для детектирования Bond на основе полимера (Bond Polymer Refine Detection) (Leica Biosystems, Буффало Гров, Иллинойс, США, номер в каталоге DS9800, лот 46396 и 46794)
- Набор для демаскировки эпитопов Bond Epitope Retrieval 2 (Leica Biosystems, Буффало Гров, Иллинойс, США, номер в каталоге AR9640, лот ER20180)
- Реактив для блокирования белков, бессывороточный (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США, номер в каталоге X0909, лот 10117172) Человеческий гамма-глобулин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, номер в каталоге G-4386, лот SLV M0524V)

Способы IHC

Получали FFPE срезы толщиной 4 мкм, погружали в парафин и хранили при температуре 4°C до применения. Для MTB 4 мкм срезы нарезали и хранили при температуре 4°C в запаянных мешках до применения. Все IHC анализы, в том числе для соответствующих изотипических контролей, оптимизировали для автоматизированного IHC с применением платформы Leica BondRX. FFPE срезы из такого же блока ткани гиперпластической небной миндалины человека использовали в качестве положительных контролей для всех проводок IHC.

Для иммунного окрашивания FFPE микроскопические препараты просушивали, депарафинизировали в ксилолах и регидратировали посредством последовательного

помещения в серию растворов с уменьшающимися концентрациями этанола, следуя стандартным гистологическим процедурам. Демаскировку антигенов осуществляли на инструменте Leica Bond RX. Процедуры автоматизированного IHC окрашивания осуществляли при комнатной температуре на Leica Bond RX. Кратко, микроскопические препараты блокировали в блокирующем растворе пероксидазы в течение 10 минут с последующим блокированием неспецифических белков в течение 20 минут. Первичные антитела инкубировали в течение 60 минут с последующим инкубированием с линкером для выявления (Refine Linker) в течение 30 минут. Микроскопические препараты затем инкубировали с полимером для выявления (Refine Polymer) в течение 30 минут. Наконец, проводили реакцию микроскопических препаратов с раствором хромогенного субстрата DAB в течение 6 минут, контрастное окрашивание в течение 8 минут с использованием гематоксилина Leica, а затем подвергали дегидратации, просветлению и накрывали покровным стеклом со средой Permount для заключения препаратов, следуя стандартной гистологической процедуре.

После иммуноокрашивания все микроскопические препараты сканировали при 20-кратном увеличении с применением сканера цельного препарата Aperio AT2 (Leica Biosystems Imaging, Виста, Калифорния, США) и изображения хранили и систематизировали с применением программного обеспечения Aperio eSlide Manager.

Патологическая оценка и ручные методы оценки

Обученный патоморфолог оценивал срезы для определения соответствия ткани и качества окрашивания. Обученный патоморфолог вручную оценивал окрашенные в отношении HLA-E микроскопические IHC препараты и рассматривал микроскопические препараты изотипического контроля и положительного контроля. Патологическая оценка заключалась в оценке H&E окрашивания для определения содержимого опухоли и подтверждения типа опухоли. Окрашенные в отношении HLA-E микроскопические препараты для иммуногистохимического (IHC) анализа оценивали вручную с использованием отсканированных изображений цельного препарата для определения положительности в отношении опухоли и иммунных клеток. Отсутствие фонового окрашивания наблюдали на микроскопических препаратах изотипического контроля. Оценивали экспрессию HLA-E в опухолевых клетках (TC), иммунных клетках (IC) и эндотелиальных клетках. Записывали процент цитоплазматического HLA-E и мембранного HLA-E. Общая оценка HLA-E представляла собой ключевые регистрируемые данные для экспрессии HLA-E, которые состоят из объединенных результатов положительности в отношении цитоплазматического и/или мембранного HLA-E в опухолевых клетках, и она представлена в виде процента положительных в отношении HLA-E клеток относительно

общего количества опухолевых клеток. Также оценивали процент положительных в отношении HLA-E у иммунных клеток вместе с преобладающим географическим положением положительных в отношении HLA-E иммунных клеток и эндотелия.

Результаты

Окрашивание в отношении HLA-E являлось диффузно положительным в гиперпластических небных миндалинах. Окрашивание в отношении мембранного/цитоплазматического HLA-E отмечали в эпителии крипт, герминативных центрах лимфатических узлов и межфолликулярных зонах с наибольшей интенсивностью в мантийных зонах. В опухолевых тканях специфическую экспрессию HLA-E наблюдали в опухолевых клетках, иммунных клетках и эндотелиальных клетках. Цитоплазматическую и мембранную локализацию HLA-E отмечали в пределах опухолевых клеток при различных показаниях и проявлялся диапазон динамического изменения интенсивности, варьирующего от слабой (интенсивность 1+) до сильной (интенсивность 3+). Экспрессия HLA-E преимущественно локализовалась в цитоплазме во всех типах человеческих опухолей с отмеченной ограниченной экспрессией на плазматической мембране. Общая экспрессия HLA-E варьировала от диффузного расположения положительных опухолевых клеток до неоднородной экспрессии в некоторых случаях с низкой-очень низкой экспрессией HLA-E. Опухоли шейки матки, HNSCC, поджелудочной железы, NSCLC, мочевого пузыря и неходжкинская лимфома имели самый высокий уровень экспрессии общего HLA-E, при этом уровень экспрессии в опухолях предстательной железы, GBM и SCLC являлся самым низким, как показано на фиг. 59. RCC имела самый высокий уровень экспрессии мембранного HLA-E среди оцениваемых типов опухолей, хотя общий уровень HLA-E был относительно низким.

Заключение

В заключение стоит отметить, что данные демонстрировали диапазон динамического изменения экспрессии общего HLA-E между группами показаний для опухолей и в пределах групп показаний для опухолей. Опухоли шейки матки, HNSCC, поджелудочной железы, NSCLC и мочевого пузыря имели самый высокий уровень экспрессии общего HLA-E, в то время как опухоли предстательной железы, GBM и SCLC демонстрировали самую низкую частоту экспрессии. Это исследование обеспечивало данные для получения профиля для обоснования определения приоритета в выборе показаний для включения, например, злокачественных опухолей HNSCC, RCC, NSCLC и CRC, в клиническую разработку антител к NKG2A, описанных в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления авторы настоящего изобретения полагают, что пациенты с типами опухолей, которые имеют более низкую экспрессию

HLA-E, также будут отвечать на противоопухолевое лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе.

Пример 32. Пациенты с высокими уровнями растворимого HLA-E в сыворотке крови

Раковые пациенты с меланомой демонстрируют большие титры растворимого HLA-E в их сыворотке крови по сравнению со здоровыми донорами. (Allard M *et al.*, "Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer," PLoS One, 6:e21118 (2011)).

Новые данные из клинических испытаний ниволумаба у пациентов с NSCLC (Checkmate 063) говорят о том, что пациенты с высоким уровнем sHLA-E имеют более низкую частоту ответа на ниволумаб. (Rebmann V et al., "Soluble HLA-G and -E (sHLA-G/E) as potential biomarkers of clinical outcomes in patients (pts) with advanced, refractory squamous (SQ) NSCLC treated with nivolumab (NIVO): CheckMate 063", Cancer Res; AM2017-CT126 (2017)).

Авторы настоящего изобретения полагают, что на пациентов с высоким уровнем экспрессии HLA-E в опухолях с большей вероятностью оказывает благоприятное воздействие лечение с использованием антител к NKG2A, описанных в настоящем документе, в том числе антитела NKG2A.9, либо отдельно, либо в комбинации, например, с ниволумабом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления медицинский работник выбирает пациентов с конкретным уровнем HLA-E, такого как растворимый HLA-E, для лечения с использованием антител к NKG2A.9, описанных в настоящем документе. В соответствии с другими вариантами осуществления медицинский работник выбирает пациентов с конкретным уровнем экспрессии CD8+ (в качестве заменителя для экспрессии NKG2A) для лечения с использованием антител к NKG2A.9, описанных в настоящем документе.

Селективный и чувствительный иммуноанализ на основе SIMOA для измерения sHLA-E (LLOQ: 11 пг/мл) разработали и применяли для исследования двух независимых наборов образцов: (A) первый набор, который содержит образцы сыворотки и плазмы крови от здоровых контролей (n=17) и от пациентов с шестью типами рака (n=10 пациентов на тип рака) (фиг. 49A), и (B) второй набор из 100 здоровых контролей и 100 пациентов с раком легкого (фиг. 49B). В обоих наборах наблюдали межпациентную вариабельность с подобными диапазонами у здоровых доноров и пациентов с раком. Этот анализ подтвердит уровни растворимого HLA-E в качестве прогностического маркера ответа на ниволумаб при использовании этого анализа.

В пределах каждого типа опухоли наблюдали значимую межпациентную вариабельность в отношении экспрессии HLA-E, как показано на фиг. 49. Авторы настоящего изобретения полагают, что на пациентов с более высокими уровнями HLA-E и более высокими уровнями CD8+ (при использовании CD8+ в качестве заменителя для экспрессии NKG2A) в опухоли будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование NKG2A для восстановления противоопухолевой активности CD8+ T- и NK-клеток.

Пример 33. Исследование фазы 1/фазы 2 с использованием антитела NKG2A.9

Авторы настоящего изобретения проведут исследование фазы I/II с использованием антитела NKG2A.9 для разработки безопасной и эффективной терапии для лечения рака. Не вдаваясь в какой-либо механизм, терапия будет восстанавливать Т-клеточный ответ на ингибиторы контрольных точек у устойчивых/невосприимчивых к PD-L1 опухолей и/или усиливать активность NK в обогащенных NK солидных опухолях.

План клинической разработки кратко изложен в таблице 9 ниже.

Таблица 9. План клинической разработки антитела к NKG2A

Антитело к NKG2A с ниволумабом	
Блокада контрольной точки антителом к NKG2A в комбинации с ниволумабом будет синергично усиливаться, расширяя благоприятное воздействие и углубляя ответ в опухолях, устойчивых или невосприимчивых к терапии, направленной против PD-L1, или ассоциированных со слабым ответом на терапию, направленную против PD-L1	Отбор пациентов с: • Опухоли с воспалением или имеющие высокий уровень TMB с известной активностью против PD-1, но менее чем полным ответом и высокой экспрессией HLA-E и/или CD8 (в качестве заменителя для экспрессии NKG2A); и/или • Опухоли, ассоциированные с вирусной этиологией и высокой экспрессией CD8 (заменитель NKG2A) и/или HLA-E; и/или • Опухоли, которые рецидивируют после лечения, направленного против PD-1, и имеют высокую экспрессию CD8 (заменитель NKG2A) и/или общего HLA-E в опухоли.
Антитело к NKG2A с другими I-O средствами и комбинациями нескольких контрольных точек	
Антитело к NKG2A в комбинации с несколькими ингибиторами контрольных точек будет преодолевать I-O устойчивость благодаря резервным путям с участием контрольных точек и	Отбор пациентов с: Опухоли с воспалением или высоким уровнем TMB с экспрессией нескольких белков-иммунологических контрольных точек

Таблица 9. План клинической разработки антитела к NKG2A

оптимизации клинических благоприятных воздействий.	

Клиническая разработка антитела NKG2A.9 начнется с впервые проводимого на человеке (FIH) исследования фазы 1/2. Первоначальное исследование с увеличением дозы в составе монотерапии будут осуществлять с целью определения безопасности, максимальной переносимой дозы (MTD) или максимальной вводимой дозы, PK, PD и предварительной оценки клинической активности. Первоначально в исследовании будут использовать внутривенный путь введения с подкожным введением в других группах исследования. В качестве альтернативы, можно применять внутривенный путь введения. При раздельном старте параллельное увеличение дозы будет происходить в случае комбинации антитела NKG2A.9 с ниволумабом, как проиллюстрировано на фиг. 50. Затем в случае комплексной терапии будут оценивать безопасность, MTD или максимальную вводимую дозу, PK, PD и предварительную оценку клинической активности. Блокаду контрольных точек тройными комбинациями также будут оценивать во время увеличения доз, и они включают в себя антитело NKG2A.9, ниволумаб и другие ингибиторы контрольных точек, в том числе, без ограничения, релатлимаб (антитело к LAG-3), антитело к TIM-3, антитело к TIGIT, иплимумаб, CTLA-4 NF или Probody или другие противораковые терапевтические средства, в том числе, например, химиотерапевтические средства, средства, воздействующие на передачу сигнала, такие как цетуксимаб, помимо прочих терапевтических средств.

Отбор пациентов/опухолей для когорт увеличения дозы и расширения числа пациентов, получавших лечение препаратом, будет основываться на существующем анализе профилей экспрессии из Атласа ракового генома (The Cancer Genome Atlas) (TCGA), профилей экспрессии из внутренних испытаний ниволумаба, определения профилей для уровней CD8 в образцах опухолей (в качестве заменителя для уровней NKG2A) и определения профилей для HLA-E в образцах опухолей и сыворотки крови, в том числе опухолей, индуцируемых вирусами. Например, отбор пациентов будет основываться на выборе пациентов, чьи опухоли являются CD8+ (в качестве заменителя для NKG2A) и HLA-E+, как проиллюстрировано на фиг. 50. В соответствии с еще одним вариантом осуществления отбора пациентов также будет основываться на опухолях с высоким воспалением или высокой мутационной нагрузкой опухоли.

Пациенты, включенные в это исследование, будут требоваться для получения биоптатов до лечения и во время лечения, а также серийных образцов для периферической крови для проверки гипотезы, что лечение антителом к NKG2A отдельно или в комбинации с ниволумабом повышает количество или функциональные активности CD8+ T- и NK-клеток в опухоли. Особое внимание будет уделено анализу того, коррелируют ли такие изменения в иммунном микроокружении опухоли с клиническим ответом. Фармакодинамические исследования будут оценивать маркеры взаимодействия с целью, активацию Т-клеток, изменения в поверхностной экспрессии NKG2A, IFN-γ и sHLA-E в сыворотке крови. Необязательно, будут включены субъекты с NKG2A-положительными и HLA-E+ опухолями (в том числе, без ограничения, немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), почечно-клеточной карциномой (RCC) и плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC)) и опухолями вирусного происхождения (злокачественные опухоли головы и шеи, шейки матки, печеночно-клеточные злокачественные опухоли). Субъекты могут иметь опухоли, которые являются резистентными/невосприимчивыми к терапии против PD-1/PD-L1, или опухоли, которые, как сообщалось, являются нечувствительными к терапии против PD-1/PD-L1. В качестве альтернативы, субъекты могут являться ранее не подвергавшимися воздействию лечения PD-1/PD-L1.

Перечень последовательностей представлен в таблице ниже.

Перечень последовательностей		
SEQ ID NO	**Название**	**Последовательность**
1	Нуклеотидная последовательность человеческого NKG2A (CCDS8625.1)	ATGGATAACC AAGGAGTAAT CTACTCAGAC CTGAATCTGC CCCCAAACCC 50 AAAGAGGCAG CAACGAAAAC CTAAAGGCAA TAAAAACTCC ATTTTAGCAA 100 CTGAACAGGA AATAACCTAT GCGGAATTAA ACCTTCAAAA AGCTTCTCAG 150 GATTTTCAAG GGAATGACAA AACCTATCAC TGCAAAGATT TACCATCAGC 200 TCCAGAGAAG CTCATTGTTG GGATCCTGGG AATTATCTGT CTTATCTTAA 250 TGGCCTCTGT GGTAACGATA GTTGTTATTC CCTCTACATT AATACAGAGG 300 CACAACAATT CTTCCCTGAA TACAAGAACT CAGAAAGCAC GTCATTGTGG 350 CCATTGTCCT GAGGAGTGGA TTACATATTC CAACAGTTGT TACTACATTG 400 GTAAGGAAAG AAGAACTTGG GAAGAGAGTT TGCTGGCCTG TACTTCGAAG 450 AACTCCAGTC TGCTTTCTAT AGATAATGAA GAAGAAATGA AATTTCTGTC 500 CATCATTTCA CCATCCTCAT GGATTGGTGT GTTTCGTAAC AGCAGTCATC 550 ATCCATGGGT GACAATGAAT GGTTTGGCTT TCAAACATGA GATAAAAGAC 600 TCAGATAATG CTGAACTTAA CTGTGCAGTG CTACAAGTAA ATCGACTTAA 650 ATCAGCCCAG TGTGGATCTT CAATAATATA TCATTGTAAG CATAAGCTTT 700 AG 702
2	Аминокислотная последовательность человеческого NKG2A (GenBank NP_002250.2)	MDNQGVIYSD LNLPPNPKR QQRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPE KLIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100 HNNSSLNTRT QKARHCGHC PEEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150 NSSLLSIDNE EEMKFLSII SPSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRLKSA QCGSSIIYHCK HKL 233
3	Аминокислотная последовательность человеческого NKG2C (GenBank: CAA04922.1)	MSKQRGTFSE VSLAQDPKRQ QRKPKGNKSS ISGTEQEIFQ VELNLQNPSL 50 NHQGIDKIYD CQGLLPPPEK LTAEVLGIIC IVLMATVLKT IVLIPFLEQN 100 NSSPNTRTQK ARHCGHCPEE WITYSNSCYY IGKERRTWEE SLLACTSKNS 150 SLLSIDNEEE MKFLASILPS SWIGVFRNSS HHPWVTINGL AFKHKIKDSD 200 NAELNCAVLQ VNRLKSAQCG SSMIYHCKHK L 231
Антитело NKG2A.9 (антитело 13F3.A4 с возвратной мутацией VH-I107T в каркасном участке и VK-N30S для удаления сайта дезамидирования)(SEQ ID NO: 4-17, 163)		
4	Нуклеотидная последовательность легкой цепи NKG2A.9 (включающая в себя С-концевой стоп-кодон “tag”)	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga 50 cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gggcatttcc agtgctttag 100 cctggtatca gcagaaacca gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat 150 gcctccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc 200

		tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg 250 caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac cttcggccaa 300 gggacacgac tggagattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat 350 cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt 400 gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg 450 gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500 cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag 550 cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645
5	Аминокислотная последовательность легкой цепи NKG2A.9	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
6	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NKG2A.9 (такая же как нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NKG2A.11-G1.3f) (включающая в себя С-концевой стоп-кодон “tga”)	gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cgggggggtc 50 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt tcccatagta 100 tgaactgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcc 150 ataagtagta gtagtagtta catatactac gcagactcag tgaagggccg 200 attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat ctgcaaatga 250 acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagag 300 tgggggctac cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc 350 ctcagctagc accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca 400 agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 450 ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg 500 cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca 550 gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga 650 gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgcc cagcacctg 700 aagccgaagg ggccccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 750 accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt 800 gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg 850 aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg 950 caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg 1000 agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1050 accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac 1100 ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga 1150 gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200 tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1250

		gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 1300 acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtccccggg ttga 1344
7	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NKG2A.9 (такая же как аминокислотная последовательность тяжелой цепи NKG2A.11-G1.3f) (концевой лизин отсутствует)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 447
163	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NKG2A.9 (такая же как аминокислотная последовательность тяжелой цепи NKG2A.11-G1.3f) (представлена с концевым лизином)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 447
8	Вариабельный домен тяжелой цепи NKG2A.9 (такой же как вариабельный домен тяжелой цепи NKG2A.11)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSS 118
9	Вариабельный домен легкой цепи NKG2A.9	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
10	CDR1 VH NKG2A.9	SHSMN 5
11	CDR2 VH NKG2A.9	AISSSSSYIY YADSVKG 17
12	CDR3 VH NKG2A.9	EEWGLPFDY 9
13	CDR1 VL NKG2A.9	RASQGISSAL A 11
14	CDR2 VL NKG2A.9	DASSLKS 7
15	CDR3 VL NKG2A.9	QQFNSYPLT 9
16	Константный домен тяжелой цепи NKG2A.9	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50

		HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 329
17	Константный домен легкой цепи NKG2A.9	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
Антитело NKG2A.11 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30P) (13F3.A4 с возвратной мутацией VH-I107T в каркасном участке и VK-N30P для удаления сайта дезамидирования) (SEQ ID NO: 18-21, 164-165) (SEQ ID NO: 6-7 (нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи NKG2A.11, соответственно))		
18	Нуклеотидная последовательность легкой цепи NKG2A.11 (включающая в себя С-концевой стоп-кодон “tag”)	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga 50 cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gggcattccc agtgctttag 100 cctggtatca gcagaaacca gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat 150 gcctccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc 200 tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg 250 caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac cttcggccaa 300 gggacacgac tggagattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat 350 cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt 400 gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg 450 gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500 cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag 550 cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645
19	Аминокислотная последовательность легкой цепи NKG2A.11	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214

164	Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи NKG2A.11	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
165	Аминокислотная последовательность константного домена легкой цепи NKG2A.11	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
20	Нуклеотидная сигнальная последовательность остеонектина	atgagggctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc 50 c 51
21	Аминокислотная сигнальная последовательность остеонектина	MRAWIFFLLC LAGRALA 17
Антитело NKG2A.6 (антитело 13F3.A4) (SEQ ID NO: 22-36, 166-169)		
22	Аминокислотная сигнальная последовательность для тяжелой цепи 13F3.A4	MELGLRWVFL VAILEGVQC 19
23	VH 13F3.A4 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (с 57-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGAACTGG GGCTCCGCTG GGTTTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT -57 CCAGTGT -7 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354
166	VH 13F3.A4 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (без сигнальной последовательности)	GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250

		ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354
24	Аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи VH 13F3.A4 (с 19-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MELGLRWVFL VAILEGVQC -19 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSS 118
167	Аминокислотная последовательность VH 13F3.A4 (без сигнальной последовательности)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSS 118
25	Нуклеотидная последовательность VL 13F3.A4 (с 66-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT -66 CCCAGGTGCC AGATGT -16 GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCTCTCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
168	Нуклеотидная последовательность VL 13F3.A4 (без сигнальной последовательности)	GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCTCTCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
26	VL 13F3.A4 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи) (с 22-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RC -22 AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
169	Аминокислотная последовательность VL 13F3.A4 (без сигнальной последовательности)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
27	CDR1 VH 13F3.A4	SHSMN 5

28	CDR2 VH 13F3.A4	AISSSSSYIY YADSVKG 17
29	CDR3 VH 13F3.A4	EEWGLPFDY 9
30	CDR1 VL 13F3.A4	RASQGINSAL A 11
31	CDR2 VL 13F3.A4	DASSLKS 7
32	CDR3 VL 13F3.A4	QQFNSYPLT 9
33	Константный участок тяжелой цепи CH 13F3.A4	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
34	Константный участок легкой цепи CL 13F3.A4	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
35	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 13F3.A4 (без сигнальной последовательности) Концевой лизин может отсутствовать.	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG(K) 448
36	Аминокислотная последовательность легкой цепи 13F3.A4 (без сигнальной последовательности)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.5 (антитело 11H9.A1 (SEQ ID NO: 37-50, 170-173)		

37	VH 11H9.A1 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (с 57-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGAACTGG GGCTCCGCTG GGTTTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT -57 CCAGTGT -7 GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300 TGGTTCGGGG AGATTTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
170	VH 11H9.A1 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (без сигнальной последовательности)	GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300 TGGTTCGGGG AGATTTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
38	VH 11H9.A1 (аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (с 19-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MELGLRWVFL VAILEGVQC -19 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTVSS 119
171	VH 11H9.A1 (аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи) (без сигнальной последовательности)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTVSS 119
39	VL 11H9.A1 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи) (с 66-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT -66 CCCAGGTGCC AGATGT -16 GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321

172	VL 11H9.A1 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи) (без сигнальной последовательности)	GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
40	VL 11H9.A1 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи) (с 22-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RC -22 AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
173	VL 11H9.A1 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи) (без сигнальной последовательности)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
41	CDR1 VH 11H9.A1	SYSMN 5
42	CDR2 VH 11H9.A1	SISSSSSYIY YADSVKG 17
43	CDR3 VH 11H9.A1	LLWFGEIFDY 10
44	CDR1 VL 11H9.A1	RASQGISSAL A 11
45	CDR2 VL 11H9.A1	DASSLKS 7
46	CDR3 VL 11H9.A1	QQFNSYPIT 9
47	Константный участок тяжелой цепи CH 11H9.A1	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
48	Константный участок легкой цепи CL 11H9.A1	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
49	Тяжелая цепь 11H9.A1 (без сигнальной последовательности)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200

		ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL 400 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449
50	Легкая цепь 11H9.A1 (без сигнальной последовательности)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.16 (антитело 2G6.C2) (SEQ ID NO: 51-64)		
51	VH 2G6.C2 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	GAGGTGCAAC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC GGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCAATAGCA 100 TGAACTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTTGCACAC 150 ATTAGTAGTG GTAGCAGTTT CATATACTAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CTCTCTGTCT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGACGAAGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGATGAC 300 TGGGGAATTG ATGCTTTTAA TATCTGGGGC CAAGGGACAA TGGTCACCGT 350 CTCTTCA 357
52	VH 2G6.C2 (аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVQRGGSLRL SCAASGFTFS SNSMNWIRQA PGKGLEWVAH 50 ISSGSSFIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLS LQMNSLRDED TAVYYCARDD 100 WGIDAFNIWG QGTMVTVSS 119
53	VL 2G6.C2 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTCCTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGATATTCAC TTTCGGCCCT 300 GGGACCAAAG TGGATATCAA A 321
54	VL 2G6.C2 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWIFTFGP 100 GTKVDIK 107
55	CDR1 VH 2G6.C2	SNSMN 5
56	CDR2 VH 2G6.C2	HISSGSSFIY YADSVKG 107
57	CDR3 VH 2G6.C2	DDWGIDAFNI 10

58	CDR1 VL 2G6.C2	RASQSVSSSL A 11
59	CDR2 VL 2G6.C2	DASNRAT 7
60	CDR3 VL 2G6.C2	QQRSNWIFT 9
61	Константный участок тяжелой цепи CH 2G6.C2	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
62	Константный участок легкой цепи CL 2G6.C2	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
63	Тяжелая цепь 2G6.C2	EVQLVESGGG LVQRGGSLRL SCAASGFTFS SNSMNWIRQA PGKGLEWVAH 50 ISSGSSFIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLS LQMNSLRDED TAVYYCARDD 100 WGIDAFNIWG QGTMVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL 400 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 459
64	Легкая цепь 2G6.C2	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWIFTFGP 100 GTKVDIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело 4G5.D1 (SEQ ID NO: 65-78, 174-177)		
65	VH 4G5.D1 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT -57 CCTGTCC -7 CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCGTCAGC AGTGGTCGTT 100

	(с 57-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCCG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAGTTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGAG 300 GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCACCGTC TCCTCA 367
174	Нуклеотидная последовательность VH 4G5.D1 (без сигнальной последовательности)	CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCGTCAGC AGTGGTCGTT 100 ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCCG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAGTTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGAG 300 GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCACCGTC TCCTCA 367
66	Аминокислотная последовательность VH 4G5.D1 (с 19-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MKHLWFFLLL VAAPRWVLS -19 QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPGKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYYNMD VWGPGTTVTV SS 122
175	Аминокислотная последовательность VH 4G5.D1 (без сигнальной последовательности)	QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPGKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYYNMD VWGPGTTVTV SS 122
67	Нуклеотидная последовательность VL 4G5.D1 (с 60-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA -60 TACCACCGGA -10 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTA CACTTTTGGC 300 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324
176	Нуклеотидная последовательность VL 4G5.D1 (без сигнальной последовательности)	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTA CACTTTTGGC 300

		CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324
68	Аминокислотная последовательность VL 4G5.D1 (с 20-аминокислотной сигнальной последовательностью)	METPAQLLFL LLLWLPDTTG -20 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGTKLEIK 108
177	Аминокислотная последовательность VL 4G5.D1 (без сигнальной последовательности)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGTKLEIK 108
69	CDR1 VH 4G5.D1	SGRYYWS 8
70	CDR2 VH 4G5.D1	YIYYSGSTNY NPSLKS 16
71	CDR3 VH 4G5.D1	EGGDYYYYNM DV 12
72	CDR1 VL 4G5.D1	RASQSVSSSY LA 12
73	CDR2 VL 4G5.D1	GASSRAT 7
74	CDR3 VL 4G5.D1	QQYGSSPYT 9
75	Константный участок тяжелой цепи CH 4G5.D1	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
76	Константный участок легкой цепи CL 4G5.D1	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
77	Тяжелая цепь 4G5.D1	QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPGKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYYNMD VWGPGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL 150 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT 200 QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP 250

		KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE 350 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP 400 PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP 450 GK 452
78	Легкая цепь 4G5.D1	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGTKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ 200 GLSSPVTKSF NRGEC 215
Антитело 1G5.B2 (SEQ ID NO: 79-92, 178-181)		
79	Нуклеотидная последовательность VH 1G5.B2 (с 57-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT -57 CCAGTGT -7 CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCACTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150 ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
178	Нуклеотидная последовательность VH 1G5.B2 (без сигнальной последовательности)	CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCACTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150 ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
80	Аминокислотная последовательность VH 1G5.B2 (с 19-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MEFGLSWVFL VALLRGVQC -19 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLTF 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGTLVTVSS 119
179	Аминокислотная последовательность VH 1G5.B2	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLTF 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGTLVTVSS 119

	(без сигнальной последовательности)	
81	Нуклеотидная последовательность VL 1G5.B2 (с 60-нуклеотидной сигнальной последовательностью)	ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA -60 TACCACCGGA -10 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGTGGACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAAA 318
180	Нуклеотидная последовательность VL 1G5.B2 (без сигнальной последовательности)	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGTGGACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAAA 318
82	Аминокислотная последовательность VL 1G5.B2 (с 20-аминокислотной сигнальной последовательностью)	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG -20 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIK 106
181	Аминокислотная последовательность VL 1G5.B2 (без сигнальной последовательности)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIK 106
83	CDR1 VH 1G5.B2	DYAMH 5
84	CDR2 VH 1G5.B2	FISYDGSNKY HADSVKG 17
85	CDR3 VH 1G5.B2	DSWDRGYFDL 10
86	CDR1 VL 1G5.B2	RASQSVSSYL A 11
87	CDR2 VL 1G5.B2	DASNRAT 7
88	CDR3 VL 1G5.B2	QQRSNWWT 8
89	Константный участок тяжелой цепи CH 1G5.B2	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250

		LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
90	Константный участок легкой цепи CL 1G5.B2	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
91	Тяжелая цепь 1G5.B2 (без сигнальной последовательности)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLTF 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL 400 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449
92	Легкая цепь 1G5.B2 (без сигнальной последовательности)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
Антитело P1-069366 (SEQ ID NO: 93-104)		
93	VH P1-069366 (аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVAV 50 ISYDGSYKEY ADSVKGRFTI SRDSSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARAQ 100 ISEYFDYWGQ GTLVTVSS 118
94	VL P1-069366 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGQ 100 GTKVEIK 107
95	CDR1 VH P1-069366	SYAMH 5
96	CDR2 VH P1-069366	VISYDGSYKEYADSVKG
97	CDR3 VH P1-069366	AQISEYFDY
98	CDR1 VL P1-069366	RASQGISSWLA

99	CDR2 VL P1-069366	AASSLQS
100	CDR3 VL P1-069366	QQYNSYPLT
101	Константный участок тяжелой цепи CH P1-069366	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 329
102	Константный участок легкой цепи CL P1-069366	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
103	Тяжелая цепь P1-069366 без сигнальной последовательности	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVAV 50 ISYDGSYKEY ADSVKGRFTI SRDSSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARAQ 100 ISEYFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 447
104	Легкая цепь P1-069366 без сигнальной последовательности	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGQ 100 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.17 (химерное антитело к NKG2A 27H4.D4)(изотип mG1-D265A)(SEQ ID NO: 105-118)		
105	VH 27H4.D4 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	CAGGTGCAAC TAGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAGGGTC 50 CCTCAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGGTT CACCTTCAGT GACTTCTACA 100 TGAGCTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GATTTCATAC 150 ATTAGTAGTA GTGATTTTAC CATATACTAC GCAGACTCTG TGGAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGGGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTTT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAAGAGGG 300 AGCCTTCCTT TCAACTACGA TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT 350

		CACCGTCTCC TCA 363
106	VH 27H4.D4 (аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFYMSWIRQA PGKGLEWISY 50 ISSSDFTIYY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRAED TAVYYCARRG 100 SLPFNYDMDV WGQGTTVTVS S 121
107	VL 27H4.D4 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCTCTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTATCA GCATAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT 150 GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGCT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTACTA TTGTCAACAG GCTAATAGTT TCCCGCTCAC TTTCGGCGGA 500 GGGACCAAGG TGGAGATCAA A 521
108	VL 27H4.D4 (аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ISCRASQGIS SYLAWYQHKP GKAPKLLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTA FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANSFPLTFGG 100 GTKVEIK 107
109	CDR1 VH 27H4.D4	DFYMS 5
110	CDR2 VH 27H4.D4	YISSSDFTIY YADSVEG 17
111	CDR3 VH 27H4.D4	RGSLPFNYDM DV 12
112	CDR1 VL 27H4.D4	RASQGISSYL A 11
113	CDR2 VL 27H4.D4	AASSLQS 7
114	CDR3 VL 27H4.D4	QQANSFPLT 9
115	Константный участок тяжелой цепи CH 27H4.D4	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
116	Константный участок легкой цепи CL 27H4.D4	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
117	Тяжелая цепь 27H4.D4 без сигнальной последовательности	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFYMSWIRQA PGKGLEWISY 50 ISSSDFTIYY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRAED TAVYYCARRG 100 SLPFNYDMDV WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV 150 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ 200

		TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK 250 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP 350 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP 400 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG 450 K 451
118	Легкая цепь 27H4.D4 без сигнальной последовательности	DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ISCRASQGIS SYLAWYQHKP GKAPKLLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTA FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANSFPLTFGG 100 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.10 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30Q)) (13F3.A4 с возвратной мутацией VH-I107T в каркасном участке и VK-N30Q для удаления сайта дезамидирования) (SEQ ID NO: 126-127)		
126	Тяжелая цепь NKG2A.10	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPA 173
127	Легкая цепь NKG2A.10	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIQ SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.12 (13F3.A4 VH-I107T) (антитело 13F3.A4 с возвратной мутацией в каркасном участке VH-107T) (SEQ ID NO: 128-129)		
128	Тяжелая цепь NKG2A.12	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448

129	Легкая цепь NKG2A.12	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.14 (13F3.A4 VK-N30Q) (антитело 13F3.A4 с N30Q для удаления сайта дезамидирования) (SEQ ID NO: 130-131)		
130	Тяжелая цепь NKG2A.14	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
131	Легкая цепь NKG2A.14	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIQ SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.15 (13F3.A4 VK-N30P) (антитело 13F3.A4 с N30P для удаления сайта дезамидирования) (SEQ ID NO: 132-133)		
132	Тяжелая цепь NKG2A.15	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
133	Легкая цепь NKG2A.15	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214

Антитело NKG2A.18 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y49S) (SEQ ID NO: 134-135)		
134	VH NKG2A.18 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
135	LH NKG2A.18 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLISD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.19 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y94T) (SEQ ID NO: 136-137)		
136	VH NKG2A.19 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
137	LH NKG2A.19 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSTPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2 A.20 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y94A) (SEQ ID NO: 138-139)		
138	VH NKG2A.20 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250

		TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
139	VH NKG2A.20 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSAPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.21 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y94N) (SEQ ID NO: 140-141)		
140	VH NKG2A.21 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
141	LH NKG2A.21 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSNPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.22 (13F3.A4 VH-Y56T-I107T, VK-N30S) (SEQ ID NO: 142-143)		
142	VH NKG2A.22 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
143	LH NKG2A.22 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150

		DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.23 (13F3.A4 VH-I57T-I107T, VK-N30S) (SEQ ID NO: 144-145)		
144	VH NKG2A.23 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
145	LH NKG2A.23 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.24 (13F3.A4 VH-Y58N-I107T, VK-N30S) (SEQ ID NO: 146-147)		
146	VH NKG2A.24 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYINY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
147	LH NKG2A.24 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
Антитело NKG2A.25 (13F3.A4 VH-Y58S-I107T, VK-N30S) (SEQ ID NO: 148-149)		
148	VH NKG2A.25	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYISY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150

	(нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи)	FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
149	LH NKG2A.25 (нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.13-G1.3f (SEQ ID NO: 150-151)		
150	NKG2A.13-G1.3f (последовательность легкой цепи)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQF NSYPLTFGQG 100 TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
151	NKG2A.13-G1.3f (последовательность тяжелой цепи)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
mNKG2A.3-mG1-D265A (SEQ ID NO: 152-153)		
152	mNKG2A.3-mG1-D265A (последовательность легкой цепи)	DIVMTQSPSS LAVSAGDKVT INCKSSQTLF SGRYNYLAWY QQKTGQAPKL 50 LIYYTSTRHT GVPGRFIGSG SGTDFTLTIN NLQTEDLGNY YCQQHYSTPY 100 TFGAGTNLEI RRADAAPTVS IFPPSSEQLT SGGASVVCFL NNFYPKDINV 150 KWKIDGSERQ NGVLNSWTDQ DSKDSTYSMS STLTLTKDEY ERHNSYTCEA 200 THKTSTSPIV KSFNRNEC 218
153	mNKG2A.3-mG1-D265A (последовательность тяжелой цепи)	QVQLKQSGAE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DGYMHWVEQN PGQGLEWIGR 50 IDPDSGYTMY NQKFQDKATL TRDKSSSTVY MELRSLTSED SAVYYCAINY 100 GEYWYFDFWG QGTQVTVSSA KTTPPSVYPL APGSAAQTNS MVTLGCLVKG 150 YFPEPVTVTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVP SSTWPSETVT 200 CNVAHPASST KVDKKIVPRD CGCKPCICTV PEVSSVFIFP PKPKDVLTIT 250 LTPKVTCVVV AISKDDPEVQ FSWFVDDVEV HTAQTQPREE QFNSTFRSVS 300

		ELPIMHQDWL NGKEFKCRVN SAAFPAPIEK TISKTKGRPK APQVYTIPPP 350 KEQMAKDKVS LTCMITDFFP EDITVEWQWN GQPAENYKNT QPIMDTDGSY 400 FVYSKLNVQK SNWEAGNTFT CSVLHEGLHN HHTEKSLSHS PGK 443
154		RASQGIPSAL A 11
155		RASQGINSAL A 11
156		LSIDNEEMKF 10
157		PSSWIGVFRN SSHHPW 16
158		LAFKHEIKDS DN 12
159		QVNRLKSAQQ CGSSIIYHC 19
160		GGGGSGGGGS GGGGS 15
161		PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT 50 ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET 100 TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT 132
162		VSNK 4
163		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
164		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
165		RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
166		GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354

167		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSS 118
168		GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCTCTCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
169		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
170		GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300 TGGTTCGGGG AGATTTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
171		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTVSS 119
172		GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
173		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
174		CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCGTCAGC AGTGGTCGTT 100 ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCCG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAGTTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGAG 300

		GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCACCGTC TCCTCA 366
175		QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPGKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYYNMD VWGPGTTVTV SS 122
176		GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTA CACTTTTGGC 300 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324
177		EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGTKLEIK 108
178		CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCACTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150 ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
179		QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLTF 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGTLVTVSS 119
180		GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGTGGACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAAA 318
181		EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIK 106
182		MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100 HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150

		NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233
183		XEWGLPFD 8
184		EXWGLPFD 8
185		EEXGLPFD 8
186		EEWXLPFD 8
187		EEWGXPFD 8
188		EEWGLXFD 8
189		EEWGLPXD 8
190		EEWGLPFX 8
191		GTFSSYSMN 9
192		GFTFSSHSMN 10
193		EEWGLPFD 8
194		RASQGSNSAL A 11
195		QQFNNYPLT 9
196		GFTFSSYSMN 10
197		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN 160
198		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYcQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEI 106
199		LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA 50 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN 80
200		LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA 50 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN 80
201		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
202		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
203		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIQ SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
204		AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
205	NP_001291377.1	MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100

		HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150 NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYH 228
206	NP_015567.2	MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100 CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150 ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLAFKHEI KDSDNAELNC AVLQVNRLKS 200 AQCGSSIIYH CKHKL 215
207	NP_998822.1	MDNQGVIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100 CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150 ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLAFKHEI KDSDNAELNC AVLQVNRLKS 200 AQCGSSIIYH CKHKL 215
208	NM_001304448.1	ACAGTTGAGA GGAGTTTGAG TGGAGATTCA GGGCCATTTT AGTATCTTCT 50 GTAGGACAGA GGTCAGCAAG CATGCCCCAG AGGTACAGAT GTATATGTCT 100 CCCAGGAAGT CTCTGTGGGT GAAGGACTGA TCTCAAGTTG TGGCTGACAC 150 TAGTTAAAGC CAAGTTAGAG GGCTGTTTCA GGGTCTACAT TGAGACTACA 200 GTTGATATGC CTACCTCCTG AGACACTAGT GTGTGAGTCT CCTCCTGGGC 250 CCCTGGGCAA ATGGTTTTGG CAGCATGACC AAGGCCTAAA TGGGGCTGAA 300 GGCAAGCACA GGAGGATGGG TCCCTTTTCA GGTCTGGAGA TGGAATCACT 350 GTTGCTATAG CAGGCCTTTT TATGAGACTA ACCTGGCCTC TCCACTAAAG 400 GATGTGTGAC TTTCTGGGGA CAGAAGAGTA CAGTCCCTGA CATCACACAC 450 TGCAGAGATG GATAACCAAG GAGTAATCTA CTCAGACCTG AATCTGCCCC 500 CAAACCCAAA GAGGCAGCAA CGAAAACCTA AAGGCAATAA AAGCTCCATT 550 TTAGCAACTG AACAGGAAAT AACCTATGCG GAATTAAACC TTCAAAAAGC 600 TTCTCAGGAT TTTCAAGGGA ATGACAAAAC CTATCACTGC AAAGATTTAC 650 CATCAGCTCC AGAGAAGCTC ATTGTTGGGA TCCTGGGAAT TATCTGTCTT 700 ATCTTAATGG CCTCTGTGGT AACGATAGTT GTTATTCCCT CTACATTAAT 750 ACAGAGGCAC AACAATTCTT CCCTGAATAC AAGAACTCAG AAAGCACGTC 800 ATTGTGGCCA TTGTCCTGAG GAGTGGATTA CATATTCCAA CAGTTGTTAC 850 TACATTGGTA AGGAAAGAAG AACTTGGGAA GAGAGTTTGC TGGCCTGTAC 900 TTCGAAGAAC TCCAGTCTGC TTTCTATAGA TAATGAAGAA GAAATGAAAT 950 TTCTGTCCAT CATTTCACCA TCCTCATGGA TTGGTGTGTT TCGTAACAGC 1000 AGTCATCATC CATGGGTGAC AATGAATGGT TTGGCTTTCA AACATGAGAT 1050 AAAAGACTCA GATAATGCTG AACTTAACTG TGCAGTGCTA CAAGTAAATC 1100 GACTTAAATC AGCCCAGTGT GGATCTTCAA TAATATATCA TTAAACTTGT 1150 TAATTTAATA CAATTTACAA CACACCTGC 1179
209	NM_002259.5	CCACTCTTGA CTCACTCTGA GCCTTCACAG GGCAGTCTGC GAAGATTGCA 50 GGCATTGTTT GTTCTTGTCT TGGATTTATG CCTTTAAATT TCACCTTTTA 100 TTACACAGCT ATAGCAGGCC TTTTTATGAG ACTAACCTGG CCTCTCCACT 150 AAAGGATGTG TGACTTTCTG GGGACAGAAG AGTACAGTCC CTGACATCAC 200

		ACACTGCAGA GATGGATAAC CAAGGAGTAA TCTACTCAGA CCTGAATCTG 250 CCCCCAAACC CAAAGAGGCA GCAACGAAAA CCTAAAGGCA ATAAAAACTC 300 CATTTTAGCA ACTGAACAGG AAATAACCTA TGCGGAATTA AACCTTCAAA 350 AAGCTTCTCA GGATTTTCAA GGGAATGACA AAACCTATCA CTGCAAAGAT 400 TTACCATCAG CTCCAGAGAA GCTCATTGTT GGGATCCTGG GAATTATCTG 450 TCTTATCTTA ATGGCCTCTG TGGTAACGAT AGTTGTTATT CCCTCTACAT 500 TAATACAGAG GCACAACAAT TCTTCCCTGA ATACAAGAAC TCAGAAAGCA 550 CGTCATTGTG GCCATTGTCC TGAGGAGTGG ATTACATATT CCAACAGTTG 600 TTACTACATT GGTAAGGAAA GAAGAACTTG GGAAGAGAGT TTGCTGGCCT 650 GTACTTCGAA GAACTCCAGT CTGCTTTCTA TAGATAATGA AGAAGAAATG 700 AAATTTCTGT CCATCATTTC ACCATCCTCA TGGATTGGTG TGTTTCGTAA 750 CAGCAGTCAT CATCCATGGG TGACAATGAA TGGTTTGGCT TTCAAACATG 800 AGATAAAAGA CTCAGATAAT GCTGAACTTA ACTGTGCAGT GCTACAAGTA 850 AATCGACTTA AATCAGCCCA GTGTGGATCT TCAATAATAT ATCATTGTAA 900 GCATAAGCTT TAGAGGTAAA GCGTTTGCAT TTGCAGTGCA TCAGATAAAT 950 TGTATATTTC TTAAAATAGA AATATATTAT GATTGCATAA ATCTTAAAAT 1000 GAATTATGTT ATTTGCTCTA ATAAGAAAAT TCTAAATCAA TTATTGAAAC 1050 AGGATACACA CAATTACTAA AGTACAGACA TCCTAGCATT TGTGTCGGGC 1100 TCATTTTGCT CAACATGGTA TTTGTGGTTT TCAGCCTTTC TAAAAGTTGC 1150 ATGTTATGTG AGTCAGCTTA TAGGAAGTAC CAAGAACAGT CAAACCCATG 1200 GAGACAGAAA GTAGAATAGT GGTTGCCAAT GTCTGAGGGA GGTTGAAATA 1250 GGAGATGACC TCTAACTGAT AGAACGTTAC TTTGTGTCGT GATGAAAACT 1300 TTCTAAATTT CAGTAGTGGT GATGGTTGTA ACTCTGCGAA TATACTAAAC 1350 ATCATTGATT TTTAATCATT TTAAGTGCAT GAAATGTATG CTTTGTACAC 1400 GACACTTCAA TAAAGCTATC CAGAAAAAAA AAAAAA 1436
210	NM_007328.4	CCACTCTTGA CTCACTCTGA GCCTTCACAG GGCAGTCTGC GAAGATTGCA 50 GGCATTGTTT GTTCTTGTCT TGGATTTATG CCTTTAAATT TCACCTTTTA 100 TTACACAGCT ATAGCAGGCC TTTTTATGAG ACTAACCTGG CCTCTCCACT 150 AAAGGATGTG TGACTTTCTG GGGACAGAAG AGTACAGTCC CTGACATCAC 200 ACACTGCAGA GATGGATAAC CAAGGAGTAA TCTACTCAGA CCTGAATCTG 250 CCCCCAAACC CAAAGAGGCA GCAACGAAAA CCTAAAGGCA ATAAAAACTC 300 CATTTTAGCA ACTGAACAGG AAATAACCTA TGCGGAATTA AACCTTCAAA 350 AAGCTTCTCA GGATTTTCAA GGGAATGACA AAACCTATCA CTGCAAAGAT 400 TTACCATCAG CTCCAGAGAA GCTCATTGTT GGGATCCTGG GAATTATCTG 450 TCTTATCTTA ATGGCCTCTG TGGTAACGAT AGTTGTTATT CCCTCACGTC 500 ATTGTGGCCA TTGTCCTGAG GAGTGGATTA CATATTCCAA CAGTTGTTAC 550 TACATTGGTA AGGAAAGAAG AACTTGGGAA GAGAGTTTGC TGGCCTGTAC 600 TTCGAAGAAC TCCAGTCTGC TTTCTATAGA TAATGAAGAA GAAATGAAAT 650 TTCTGTCCAT CATTTCACCA TCCTCATGGA TTGGTGTGTT TCGTAACAGC 700 AGTCATCATC CATGGGTGAC AATGAATGGT TTGGCTTTCA AACATGAGAT 750 AAAAGACTCA GATAATGCTG AACTTAACTG TGCAGTGCTA CAAGTAAATC 800

		GACTTAAATC AGCCCAGTGT GGATCTTCAA TAATATATCA TTGTAAGCAT 850 AAGCTTTAGA GGTAAAGCGT TTGCATTTGC AGTGCATCAG ATAAATTGTA 900 TATTTCTTAA AATAGAAATA TATTATGATT GCATAAATCT TAAAATGAAT 950 TATGTTATTT GCTCTAATAA GAAAATTCTA AATCAATTAT TGAAACAGGA 1000 TACACACAAT TACTAAAGTA CAGACATCCT AGCATTTGTG TCGGGCTCAT 1050 TTTGCTCAAC ATGGTATTTG TGGTTTTCAG CCTTTCTAAA AGTTGCATGT 1100 TATGTGAGTC AGCTTATAGG AAGTACCAAG AACAGTCAAA CCCATGGAGA 1150 CAGAAAGTAG AATAGTGGTT GCCAATGTCT GAGGGAGGTT GAAATAGGAG 1200 ATGACCTCTA ACTGATAGAA CGTTACTTTG TGTCGTGATG AAAACTTTCT 1250 AAATTTCAGT AGTGGTGATG GTTGTAACTC TGCGAATATA CTAAACATCA 1300 TTGATTTTTA ATCATTTTAA GTGCATGAAA TGTATGCTTT GTACACGACA 1350 CTTCAATAAA GCTATCCAGA AAAAAAAAAA AA 1382
211	NM_213657.2	GCATGCCCCA GAGGTACAGA TGTATATGTC TCCCAGGAAG TCTCTGTGGG 50 TGAAGGACTG ATCTCAAGTT GTGGCTGACA CTAGTTAAAG CCAAGTTAGA 100 GGGCTGTTTC AGGGTCTACA TTGAGACTAC AGTTGATATG CCTACCTCCT 150 GAGACACTAG TGTGTGAGTC TCCTCCTGGG CCCCTGGGCA AATGGTTTTG 200 GCAGCATGAC CAAGGCCTAA ATGGGGCTGA AGGCAAGCAC AGGAGGATGG 250 GTCCCTTTTC AGGTCTGGAG ATGGAATCAC TGTTGCTATA GCAGGCCTTT 300 TTATGAGACT AACCTGGCCT CTCCACTAAA GGATGTGTGA CTTTCTGGGG 350 ACAGAAGAGT ACAGTCCCTG ACATCACACA CTGCAGAGAT GGATAACCAA 400 GGAGTAATCT ACTCAGACCT GAATCTGCCC CCAAACCCAA AGAGGCAGCA 450 ACGAAAACCT AAAGGCAATA AAAGCTCCAT TTTAGCAACT GAACAGGAAA 500 TAACCTATGC GGAATTAAAC CTTCAAAAAG CTTCTCAGGA TTTTCAAGGG 550 AATGACAAAA CCTATCACTG CAAAGATTTA CCATCAGCTC CAGAGAAGCT 600 CATTGTTGGG ATCCTGGGAA TTATCTGTCT TATCTTAATG GCCTCTGTGG 650 TAACGATAGT TGTTATTCCC TCACGTCATT GTGGCCATTG TCCTGAGGAG 700 TGGATTACAT ATTCCAACAG TTGTTACTAC ATTGGTAAGG AAAGAAGAAC 750 TTGGGAAGAG AGTTTGCTGG CCTGTACTTC GAAGAACTCC AGTCTGCTTT 800 CTATAGATAA TGAAGAAGAA ATGAAATTTC TGTCCATCAT TTCACCATCC 850 TCATGGATTG GTGTGTTTCG TAACAGCAGT CATCATCCAT GGGTGACAAT 900 GAATGGTTTG GCTTTCAAAC ATGAGATAAA AGACTCAGAT AATGCTGAAC 950 TTAACTGTGC AGTGCTACAA GTAAATCGAC TTAAATCAGC CCAGTGTGGA 1000 TCTTCAATAA TATATCATTG TAAGCATAAG CTTTAGAGGT AAAGCGTTTG 1050 CATTTGCAGT GCATCAGATA AATTGTATAT TTCTTAAAAT AGAAATATAT 1100 TATGATTGCA TAAATCTTAA AATGAATTAT GTTATTTGCT CTAATAAGAA 1150 AATTCTAAAT CAATTATTGA AACAGGATAC ACACAATTAC TAAAGTACAG 1200 ACATCCTAGC ATTTGTGTCG GGCTCATTTT GCTCAACATG GTATTTGTGG 1250 TTTTCAGCCT TTCTAAAAGT TGCATGTTAT GTGAGTCAGC TTATAGGAAG 1300 TACCAAGAAC AGTCAAACCC ATGGAGACAG AAAGTAGAAT AGTGGTTGCC 1350 AATGTCTGAG GGAGGTTGAA ATAGGAGATG ACCTCTAACT GATAGAACGT 1400 TACTTTGTGT CGTGATGAAA ACTTTCTAAA TTTCAGTAGT GGTGATGGTT 1450

		GTAACTCTGC GAATATACTA AACATCATTG ATTTTTAATC ATTTTAAGTG 1500 CATGAAATGT ATGCTTTGTA CACGACACTT CAATAAAGCT ATCCAGAAAA 1550 AAAAAAAAAA AAA 1563
212	NM_213658.2	GCATGCCCCA GAGGTACAGA TGTATATGTC TCCCAGGAAG TCTCTGTGGG 50 TGAAGGACTG ATCTCAAGTT GTGGCTGACA CTAGTTAAAG CCAAGTTAGA 100 GGGCTGTTTC AGGGTCTACA TTGAGACTAC AGTTGATATG CCTACCTCCT 150 GAGACACTAG TGTGTGAGTC TCCTCCTGGG CCCCTGGGCA AATGGTTTTG 200 GCAGCATGAC CAAGGCCTAA ATGGGGCTGA AGGCAAGCAC AGGAGGATGG 250 GTCCCTTTTC AGGTCTGGAG ATGGAATCAC TGTTGCTATA GCAGGCCTTT 300 TTATGAGACT AACCTGGCCT CTCCACTAAA GGATGTGTGA CTTTCTGGGG 350 ACAGAAGAGT ACAGTCCCTG ACATCACACA CTGCAGAGAT GGATAACCAA 400 GGAGTAATCT ACTCAGACCT GAATCTGCCC CCAAACCCAA AGAGGCAGCA 450 ACGAAAACCT AAAGGCAATA AAAGCTCCAT TTTAGCAACT GAACAGGAAA 500 TAACCTATGC GGAATTAAAC CTTCAAAAAG CTTCTCAGGA TTTTCAAGGG 550 AATGACAAAA CCTATCACTG CAAAGATTTA CCATCAGCTC CAGAGAAGCT 600 CATTGTTGGG ATCCTGGGAA TTATCTGTCT TATCTTAATG GCCTCTGTGG 650 TAACGATAGT TGTTATTCCC TCTACATTAA TACAGAGGCA CAACAATTCT 700 TCCCTGAATA CAAGAACTCA GAAAGCACGT CATTGTGGCC ATTGTCCTGA 750 GGAGTGGATT ACATATTCCA ACAGTTGTTA CTACATTGGT AAGGAAAGAA 800 GAACTTGGGA AGAGAGTTTG CTGGCCTGTA CTTCGAAGAA CTCCAGTCTG 850 CTTTCTATAG ATAATGAAGA AGAAATGAAA TTTCTGTCCA TCATTTCACC 900 ATCCTCATGG ATTGGTGTGT TTCGTAACAG CAGTCATCAT CCATGGGTGA 950 CAATGAATGG TTTGGCTTTC AAACATGAGA TAAAAGACTC AGATAATGCT 1000 GAACTTAACT GTGCAGTGCT ACAAGTAAAT CGACTTAAAT CAGCCCAGTG 1050 TGGATCTTCA ATAATATATC ATTGTAAGCA TAAGCTTTAG AGGTAAAGCG 1100 TTTGCATTTG CAGTGCATCA GATAAATTGT ATATTTCTTA AAATAGAAAT 1150 ATATTATGAT TGCATAAATC TTAAAATGAA TTATGTTATT TGCTCTAATA 1200 AGAAAATTCT AAATCAATTA TTGAAACAGG ATACACACAA TTACTAAAGT 1250 ACAGACATCC TAGCATTTGT GTCGGGCTCA TTTTGCTCAA CATGGTATTT 1300 GTGGTTTTCA GCCTTTCTAA AAGTTGCATG TTATGTGAGT CAGCTTATAG 1350 GAAGTACCAA GAACAGTCAA ACCCATGGAG ACAGAAAGTA GAATAGTGGT 1400 TGCCAATGTC TGAGGGAGGT TGAAATAGGA GATGACCTCT AACTGATAGA 1450 ACGTTACTTT GTGTCGTGAT GAAAACTTTC TAAATTTCAG TAGTGGTGAT 1500 GGTTGTAACT CTGCGAATAT ACTAAACATC ATTGATTTTT AATCATTTTA 1550 AGTGCATGAA ATGTATGCTT TGTACACGAC ACTTCAATAA AGCTATCCAG 1600 AAAAAAAAAA AAAAAAA 1617

Таблица 2. Аминокислотные последовательности V_H, V_L, C_H, C_L, тяжелой цепи и легкой цепи моноклонального антитела NKG2A.9 (также известного как 13F3-VH-I107T-Vk-N30S IgG1.3) (далее в настоящем документе называемое «антителом NKG2A.9»)

	Аминокислотные последовательности (SEQ ID NO)
Вариабельный домен тяжелой цепи (V_H)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSS 118 (SEQ ID NO:8)
Вариабельный домен легкой цепи (V_L)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107 (SEQ ID NO:9)
Константный домен тяжелой цепи (C_H) (С-концевой лизин (K) не показан, но может быть включен в некоторые варианты осуществления)	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 329 (SEQ ID NO:16)
Константный домен легкой цепи (C_L)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107 (SEQ ID NO:17)
Тяжелая цепь (С-концевой лизин (K) не показан, но может быть включен в некоторые варианты осуществления)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 447

	(SEQ ID NO:7)
Легкая цепь	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214 (SEQ ID NO: 5)

Таблица 3. Аминокислотные последовательности для шести доменов CDR антитела NKG2A.9

Аминокислотные последовательности (SEQ ID NO)					
CDR1 VH	**CDR2 VH**	**CDR3 VH**	**CDR1 VL**	**CDR2 VL**	**CDR3 VL**
SHSMN (SEQ ID NO:10)	AISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:11)	EEWGLPFDY (SEQ ID NO:12)	RASQGISSALA (SEQ ID NO:13)	DASSLKS (SEQ ID NO:14)	QQFNSYPLT (SEQ ID NO:15)

Таблица 4. Аминокислотные последовательности для шести доменов CDR антитела NKG2A.11

Аминокислотные последовательности (SEQ ID NO)					
CDR1 VH	**CDR2 VH**	**CDR3 VH**	**CDR1 VL**	**CDR2 VL**	**CDR3 VL**
SHSMN (SEQ ID NO:10)	AISSSSSYI YYADSVKG (SEQ ID NO:11)	EEWGLPFDY (SEQ ID NO:12)	RASQGIPSALA (SEQ ID NO:154)	DASSLKS (SEQ ID NO:14)	QQFNSYPLT (SEQ ID NO:15)

Таблица 5. Аминокислотные последовательности для шести доменов CDR антитела 13F3.A4

Аминокислотные последовательности (SEQ ID NO)					
CDR1 VH	**CDR2 VH**	**CDR3 VH**	**CDR1 VL**	**CDR2 VL**	**CDR3 VL**
SHSMN (SEQ ID NO:10)	AISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:11)	EEWGLPFDY (SEQ ID NO:12)	RASQGINSALA (SEQ ID NO:155)	DASSLKS (SEQ ID NO:14)	QQFNSYPLT (SEQ ID NO:15)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывают белок ингибирующего рецептора клеток-натуральных киллеров группы 2A (NKG2A) человека и характеризуются по меньшей мере одним из следующих свойств:

(a) уменьшают связывание и/или взаимодействие HLA-E с белком NKG2A человека;

(b) обращают опосредованную NKG2A передачу ингибирующих сигналов;

(c) не связываются или связываются с низкой аффинностью с белком NKG2C человека;

(d) связываются с белком NKG2A человека или яванского макака;

(e) усиливают ответ клеток-натуральных киллеров;

(f) усиливают функциональную активность Т-клеток;

(g) обладают уменьшенным связыванием с человеческим Fc-гамма-рецептором (FcγR);

(h) индуцируют и/или усиливают противоопухолевый иммунный ответ; и/или

(i) обладают низкой иммуногенностью у субъектов-людей.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, причем антитело обладает одним или несколькими из следующих свойств:

(a) характеризуется значением EC_{50} приблизительно 0,6 нМ или ниже для связывания с белком NKG2A человека по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(b) характеризуется значением EC_{50} приблизительно 9,0 нМ или выше для связывания с белком NKG2C человека по результатам измерения с помощью анализа связывания с клетками;

(c) характеризуется значением EC_{50} для связывания с белком NKG2A человека, которое приблизительно в 15 раз меньше второго значения EC_{50} для связывания с белком NKG2C человека;

(d) характеризуется значением IC_{50} приблизительно 1,0 нМ или ниже по результатам измерения с помощью анализа блокировки с клетками;

(e) связывается с белком NKG2A человека с K_D приблизительно 0,4 нМ или ниже по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(f) связывается с белком NKG2A человека с K_D приблизительно 61 нМ или ниже по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(g) связывается с белком NKG2A яванского макака с K_D приблизительно 1,0 нМ или ниже по результатам измерения с помощью анализа Скэтчарда;

(h) интернализуется при связывании с NKG2A-экспрессирующими клетками;

(i) увеличивает продуцирование гамма-интерферона (IFNγ);

(j) причем период полужизни комплекса антитело к NKG2A:белок NKG2A составляет приблизительно 40 секунд или дольше; и/или

(k) характеризуется интернализацией со значением EC_{50} приблизительно 0,5 нМ или ниже.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, причем антитело уменьшает связывание и/или взаимодействие HLA-E с белком NKG2A человека.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, причем антитело связывается с белком NKG2A человека.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, причем антитело содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11, 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, 14 и 15;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 154, 14 и 15; или

(c) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 155, 14 и 15.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека и содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем

(a) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 167, и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 164 или SEQ ID NO: 169.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, а вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, а вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 167, а вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 169.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека, причем тяжелая и легкая цепи фактически состоят из:

(a) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 5 соответственно;

(b) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 19 соответственно; или

(c) аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с белком NKG2A или связываются с тем же эпитопом, что и любое из предшествующих антител.

12. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые при связывании с белком NKG2A человека специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS):

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156);

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157);

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158); и

(d) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159),

причем антитело блокирует связывание HLA-E с белком NKG2A человека.

13. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые при связывании с NKG2A человека специфически связываются со следующими аминокислотными остатками, которые определены методом HDX-MS и/или путем картирования эпитопов методом быстрого фотохимического окисления белков (FPOP):

(a) LSIDNEEMKF (SEQ ID NO: 156)

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (SEQ ID NO: 157)

(c) LAFKHEIKDSDN (SEQ ID NO: 158)

(d) L; и

(e) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (SEQ ID NO: 159),

причем антитело блокирует связывание HLA-E с белком NKG2A человека.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, причем антитело представляет собой полноразмерное антитело.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, причем полноразмерное антитело представляет собой антитело IgG1.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, причем антитело представляет собой фрагмент антитела.

17. Антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, причем фрагмент антитела представляет собой Fab-, Fab'-, (Fab')2-, Fv- или scFv-фрагмент.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, причем антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

19. Выделенное, полноразмерное моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком NKG2A человека, причем

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7, и/или

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5.

20. Выделенное, полноразмерное моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком NKG2A человека, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 19.

21. Выделенное, полноразмерное моноклональное антитело, которое специфически связывается с NKG2A человека, причем тяжелая цепь фактически состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7, а легкая цепь фактически состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19.

22. Выделенное, полноразмерное моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком NKG2A человека, причем

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7, и

легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99%, приблизительно на 100% или на 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком NKG2A человека и перекрестно конкурируют за связывание с белком NKG2A человека с эталонным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи (VH) и вариабельный участок легкой цепи (VL), причем:

(a) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, а VL содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9;

(b) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, а VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:164; или

(c) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 167, а VL при этом содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 169.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный участок тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов.

25. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 24, причем молекула нуклеиновой кислоты представляет собой комплементарную ДНК (кДНК).

26. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 24 или п. 25.

27. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п. 26.

28. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, связанные со средством.

29. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п. 27, при этом продуцируется указанное антитело.

30. Способ по п. 29, дополнительно предусматривающий выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина.

31. Биспецифическая молекула, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, связанные со вторым функциональным фрагментом.

32. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23 или биспецифическую молекулу по п. 31 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Композиция по п. 32, дополнительно содержащая дополнительное терапевтическое средство.

34. Композиция по п. 33, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и/или антитело к CTLA-4.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23 для применения в качестве лекарственного препарата для лечения рака.

36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 35, причем рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому, рак эндометрия, рак шейки матки, рак ЖКТ, меланому, рак почки, рак уротелия, мультиформную глиобластому или связанный с вирусом рак.

37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, причем рак представляет собой рак шейки матки, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого по типу аденокарциномы, немелкоклеточный рак легкого по типу плоскоклеточного, рак ЖКТ, меланому, колоректальный рак, рак эндометрия, яичников, почечно-клеточную карциному, рак уротелия, молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, мультиформную глиобластому, рак предстательной железы или неходжкинскую лимфому.

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23 для применения при усилении иммунного ответа.

39. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-23 при производстве лекарственного препарата для лечения рака.

40. Способ лечения или замедления прогрессирования рака у субъекта-человека, предусматривающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из пп. 1-23, иммуноконъюгата по п. 28, биспецифической молекулы по п. 31 или композиции по п. 33 или п. 34 для лечения или замедления прогрессирования рака.

41. Способ по п. 40, причем рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому, рак эндометрия, рак шейки матки, рак ЖКТ, меланому, рак почки, рак уротелия, мультиформную глиобластому или связанный с вирусом рак.

42. Способ по п. 41, причем рак представляет собой рак шейки матки, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак поджелудочной железы,

немелкоклеточный рак легкого по типу аденокарциномы, немелкоклеточный рак легкого по типу плоскоклеточного, рак ЖКТ, меланому, колоректальный рак, рак эндометрия, яичников, почечно-клеточную карциному, рак уротелия, молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, мультиформную глиобластому, рак предстательной железы или неходжкинскую лимфому.

43. Способ по п. 41 или п. 42, дополнительно предусматривающий введение субъекту-человеку одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

44. Способ по п. 43, причем одно или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство и/или иммунотерапевтическое средство.

45. Способ по п. 44, причем иммунотерапевтическое средство представляет собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и/или антитело к CTLA-4.

46. Способ по п. 45, причем антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб, а антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

47. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта-человека, предусматривающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из пп. 1-23, иммуноконъюгата по п. 28, биспецифической молекулы по п. 31 или композиции по п. 33, п. 34 или п. 35 для стимуляции иммунного ответа.

48. Способ по п. 47, причем у субъекта-человека есть опухоль, и у него стимулируют противоопухолевый иммунный ответ.

49. Способ по п. 47, причем у субъекта-человека есть хроническая вирусная инфекция , и у него стимулируют противовирусный иммунный ответ.

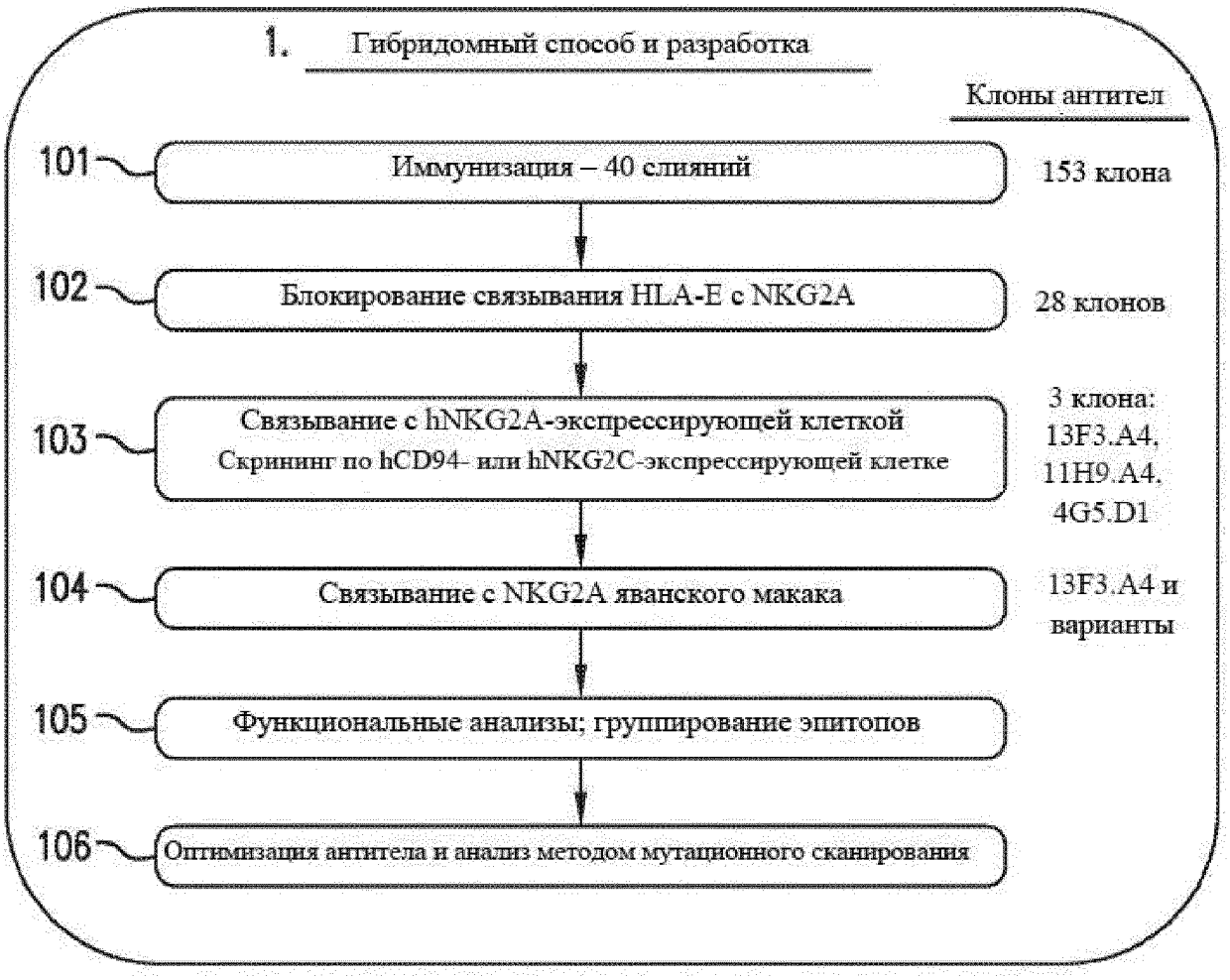
50. Способ детекции наличия белка NKG2A в образце, предусматривающий

приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-23 в условиях, которые делают возможным образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и белком NKG2A, и

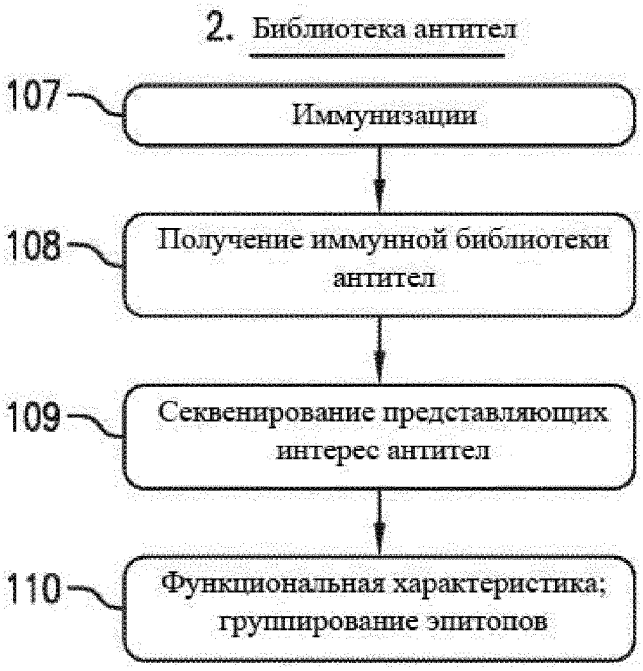
детекцию образования комплекса.

51. Способ по п. 50, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с белком NKG2A быстрее, чем с белком NKG2C.

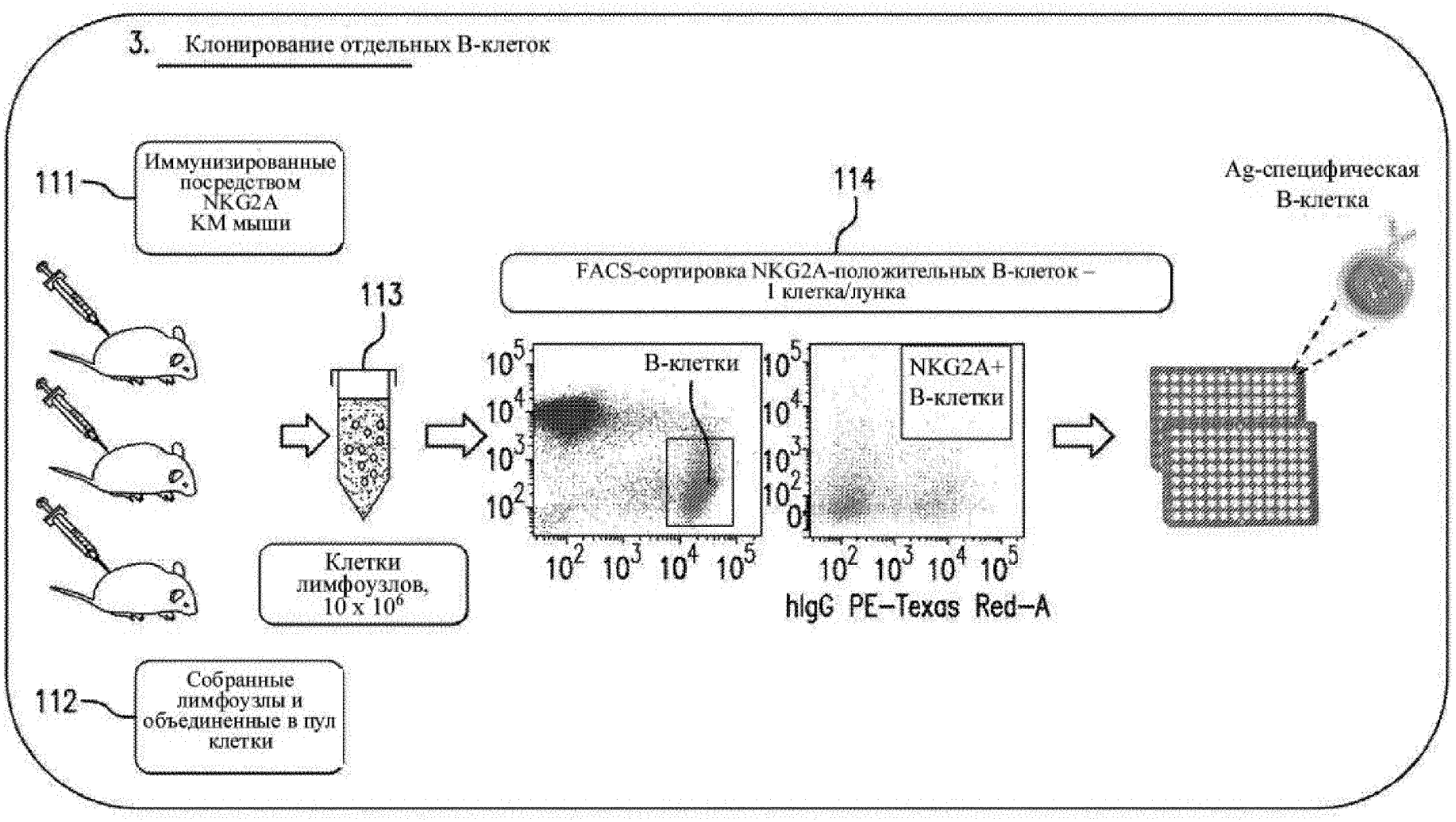
52. Способ по п. 51, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с белком NKG2A в 15 раз быстрее, чем с белком NKG2C.


1. Гибридомный способ и разработка
Клоны антител
101
Иммунизация – 40 слияний
153 клона
102
Блокирование связывания HLA-E с NKG2A
28 клонов
103
Связывание с hNKG2A-экспрессирующей клеткой
Скрининг по hCD94- или hNKG2C-экспрессирующей клетке
3 клона: 13F3.A4, 11H9.A4, 4G5.D1
104
Связывание с NKG2A яванского макака
13F3.A4 и варианты
105
Функциональные анализы; группирование эпитопов
106
Оптимизация антитела и анализ методом мутационного сканирования

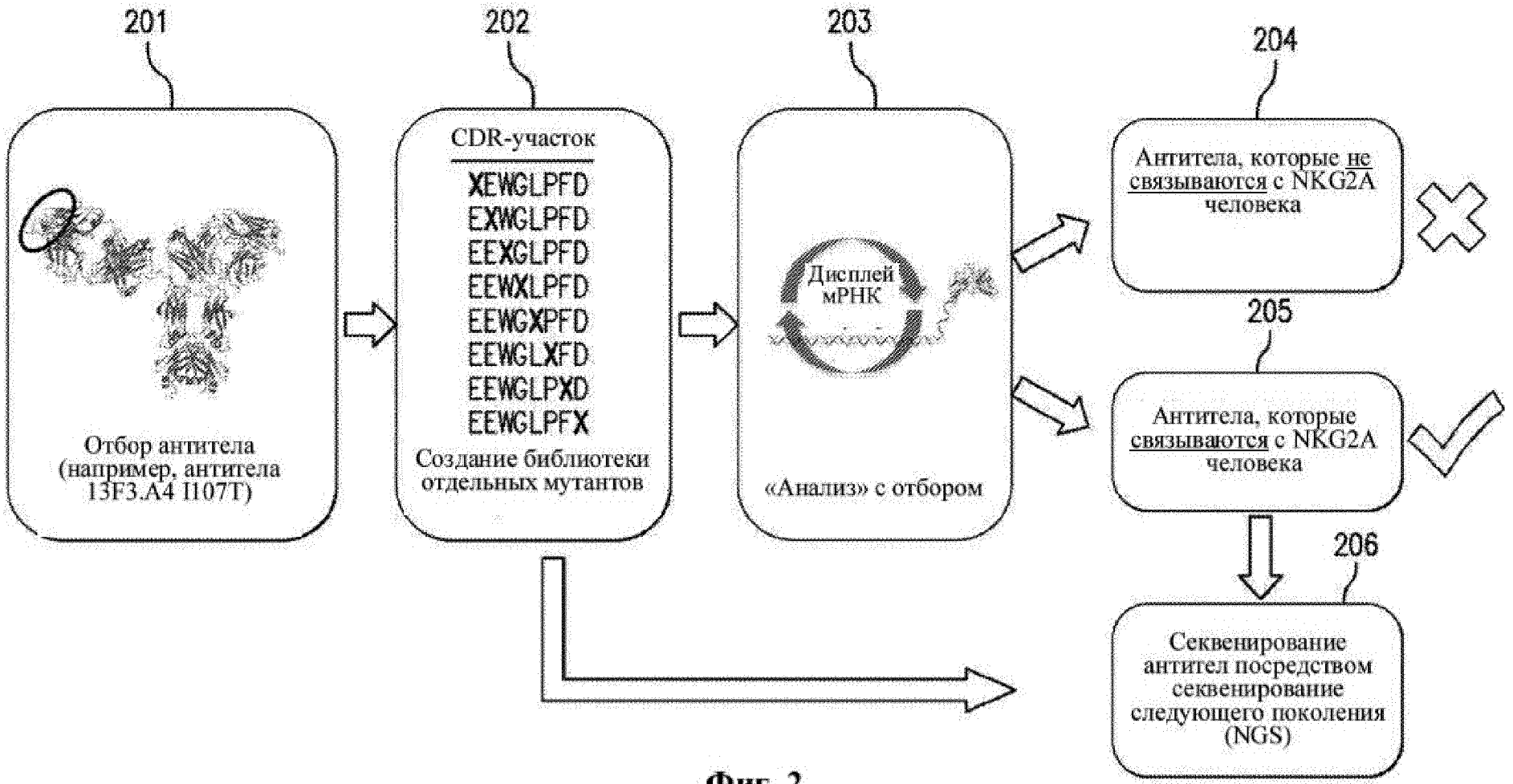
Фиг. 1A


2. Библиотека антител
107
Иммунизации
108
Получение иммунной библиотеки антител
109
Секвенирование представляющих интерес антител
110
Функциональная характеристика; группирование эпитопов

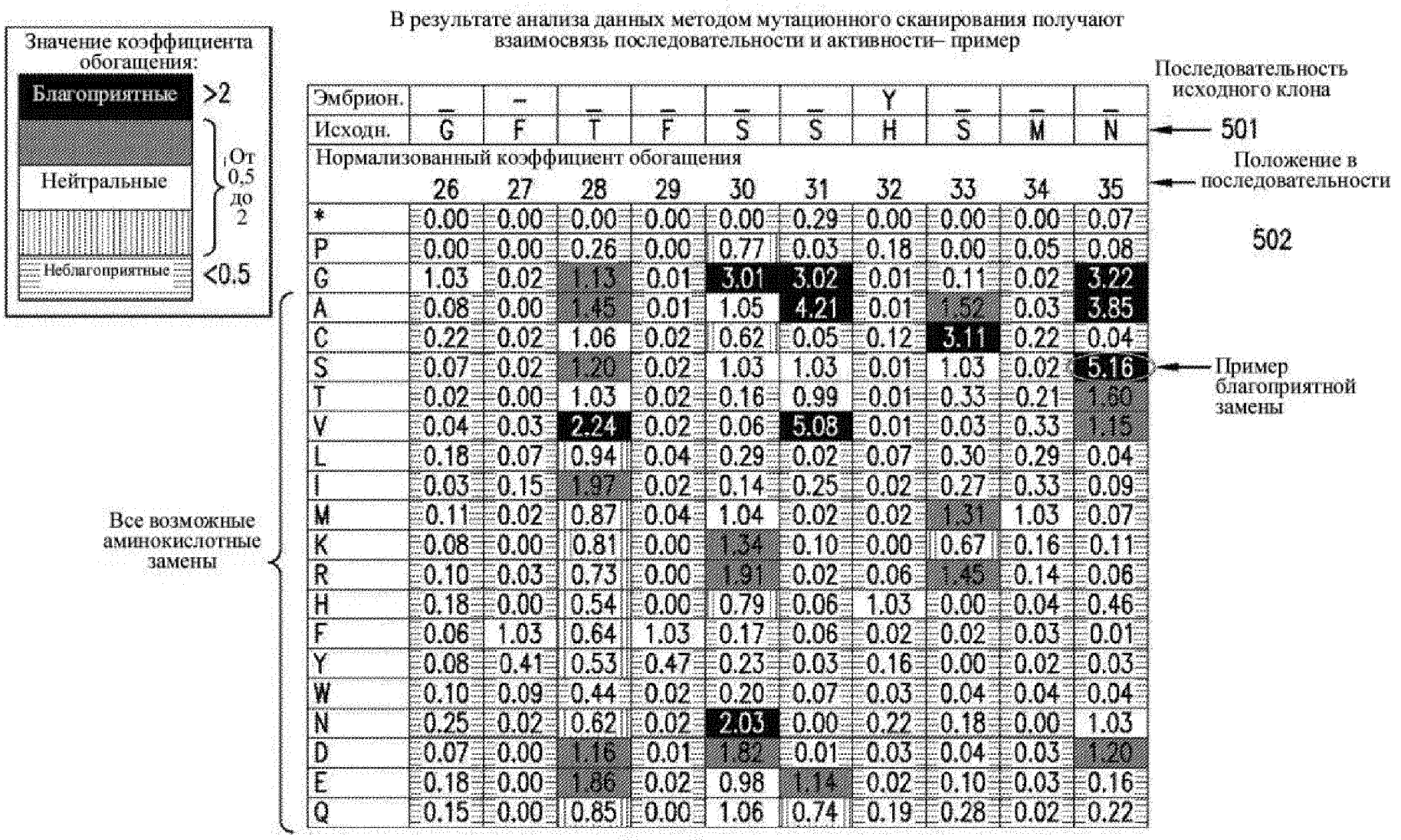
Фиг. 1B


3. Клонирование отдельных В-клеток
111
Иммунизированные посредством NKG2A КМ мыши
112
Собранные лимфоузлы и объединенные в пул клетки
113
Клетки лимфоузлов, 10 x 10^6
114
FACS-сортировка NKG2A-положительных В-клеток – 1 клетка/лунка
В-клетки
NKG2A+ В-клетки
hIgG PE–Texas Red–A
Ag-специфическая В-клетка

Фиг. 1C


201
202
203
204
205
206
CDR-участок
XEWGLPFD
EXWGLPFD
EEXGLPFD
EEWXLPFD
EEWGXPFD
EEWGLXFD
EEWGLPXD
EEWGLPFX
Отбор антитела (например, антитела 13F3.A4 I107T)
Создание библиотеки отдельных мутантов
Дисплей мРНК
«Анализ» с отбором
Антитела, которые не связываются с NKG2A человека
Антитела, которые связываются с NKG2A человека
Секвенирование антител посредством секвенирование следующего поколения (NGS)

Фиг. 2



Эмбрион.	_	_	_	_	_	_	Y	_	_	_
Исходн.	G	F	T	F	S	S	H	S	M	N
Нормализованный коэффициент обогащения										
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.07
P	0.00	0.00	0.26	0.00	0.77	0.03	0.18	0.00	0.05	0.08
G	1.03	0.02	1.13	0.01	3.01	3.02	0.01	0.11	0.02	3.22
A	0.08	0.00	1.45	0.01	1.05	4.21	0.01	1.52	0.03	3.85
C	0.22	0.02	1.06	0.02	0.62	0.05	0.12	3.11	0.22	0.04
S	0.07	0.02	1.20	0.02	1.03	1.03	0.01	1.03	0.02	5.16
T	0.02	0.00	1.03	0.02	0.16	0.99	0.01	0.33	0.21	1.60
V	0.04	0.03	2.24	0.02	0.06	5.08	0.01	0.03	0.33	1.15
L	0.18	0.07	0.94	0.04	0.29	0.02	0.07	0.30	0.29	0.04
I	0.03	0.15	1.97	0.02	0.14	0.25	0.02	0.27	0.33	0.09
M	0.11	0.02	0.87	0.04	1.04	0.02	0.02	1.31	1.03	0.07
K	0.08	0.00	0.81	0.00	1.34	0.10	0.00	0.67	0.16	0.11
R	0.10	0.03	0.73	0.00	1.91	0.02	0.06	1.45	0.14	0.06
H	0.18	0.00	0.54	0.00	0.79	0.06	1.03	0.00	0.04	0.46
F	0.06	1.03	0.64	1.03	0.17	0.06	0.02	0.02	0.03	0.01
Y	0.08	0.41	0.53	0.47	0.23	0.03	0.16	0.00	0.02	0.03
W	0.10	0.09	0.44	0.02	0.20	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04
N	0.25	0.02	0.62	0.02	2.03	0.00	0.22	0.18	0.00	1.03
D	0.07	0.00	1.16	0.01	1.82	0.01	0.03	0.04	0.03	1.20
E	0.18	0.00	1.86	0.02	0.98	1.14	0.02	0.10	0.03	0.16
Q	0.15	0.00	0.85	0.00	1.06	0.74	0.19	0.28	0.02	0.22

Фиг. 3

Мутационное сканирование антител 13F3 I107T к NKG2A –
анализируемые положения CDR

Легкая цепь											
LCDR1	24 R	25 A	26 S	27 Q	28 G	29 I	30 N	31 S	32 A	33 L	34 A
LCDR2	Нет										
LCDR3	89 Q	90 Q	91 F	92 N	93 S	94 Y	95 P	96 L	97 T		
Тяжелая цепь											
HCDR1*	26 G	27 F	28 T	29 F	30 S	31 S	32 H	33 S	34 M	35 N	
HCDR2	50 A	51 I	52 S	52a S	53 S	54 S	55 S	56 Y	57 I	58 Y	59 Y	60 A	61 D	62 S	63 V	64 K	65 G
HCDR3	95 E	96 E	97 W	98 G	99 L	100 P	100a F	101 D			

* Для всех CDR использовали определение по Kabat, за исключением HCDR1, где использовали определение для AbM

Фиг. 4

Антитело 13F3 I107T – замены LCDR1



Эмбрион.	_	_	_	_	_	S	_	_	_	_	_
Исходн.	R	A	S	Q	G	I	N	S	A	L	A
Нормализованный коэффициент обогащения											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
*	0.26	0.00	0.00	0.90	0.33	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00	0.11
P	0.43	1.72	1.37	0.70	1.26	1.88	2.22	2.30	0.12	0.03	0.08
G	0.89	1.10	0.93	2.02	1.00	1.84	0.65	4.66	0.82	0.40	0.18
A	0.99	1.00	1.33	1.46	1.04	0.80	0.78	1.20	1.00	0.54	1.00
C	1.23	2.69	1.02	1.26	1.13	3.43	1.23	2.83	1.53	0.59	0.09
S	1.38	0.95	1.00	1.20	0.90	1.29	0.80	1.00	0.65	0.40	0.11
T	1.14	2.61	1.23	1.15	1.22	1.99	0.77	0.62	1.42	0.82	0.51
V	0.84	2.12	1.00	0.97	1.38	0.94	0.53	0.49	4.72	1.13	0.68
L	0.86	1.92	0.98	0.92	2.16	0.87	0.62	0.81	1.59	1.00	0.01
I	0.61	1.70	0.77	0.92	1.18	1.00	0.54	0.67	5.26	1.06	0.02
M	0.97	2.45	0.95	1.20	1.08	1.49	0.65	1.44	1.04	0.45	0.02
K	1.12	0.31	1.20	0.71	1.07	1.36	0.59	0.18	0.02	0.04	0.04
R	1.00	0.18	1.08	0.65	0.86	0.98	0.39	0.28	0.03	0.03	0.02
H	0.94	0.43	0.99	1.06	1.04	2.09	0.73	0.76	0.54	0.08	0.37
F	0.94	0.86	1.08	0.98	1.23	2.97	0.62	1.00	2.45	0.25	0.02
Y	1.23	0.65	1.03	0.99	1.12	1.57	0.55	1.08	2.12	0.07	0.05
W	0.92	0.43	0.78	0.83	0.84	0.96	0.55	0.86	1.91	0.03	0.05
N	0.99	0.69	1.16	1.36	0.62	2.04	1.00	1.99	1.10	0.16	0.02
D	0.64	0.44	1.02	1.82	1.28	3.41	1.45	4.49	2.74	0.09	0.08
E	0.81	0.81	1.32	1.48	1.75	2.67	1.45	3.06	5.98	0.10	2.66
Q	0.93	1.50	1.47	1.00	1.44	1.52	0.88	1.04	0.20	0.10	0.01

Была отобрана предпочтительная (благоприятная) замена N30P

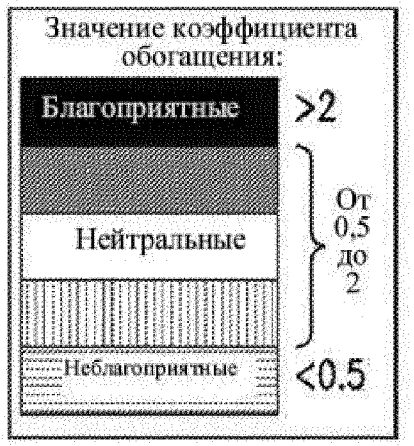
Фиг. 5A



Антитело 13F3 I107T – замены LCDR3

Эмбрион.					N				
Исходн.	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	T
Нормализованный коэффициент обогащения									
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
*	0.00	0.81	0.00	0.09	0.13	0.38	0.00	0.00	0.00
P	0.07	0.17	0.02	1.58	0.20	0.27	1.00	0.06	0.04
G	0.02	0.37	0.21	0.47	0.60	0.08	1.11	0.06	0.71
A	0.02	0.56	0.68	0.63	1.25	0.11	0.76	0.05	0.71
C	0.01	0.14	2.01	1.76	1.80	0.21	0.15	0.59	0.70
S	0.02	0.86	0.26	0.56	1.00	0.10	0.64	0.04	1.01
T	0.02	0.73	0.62	0.49	1.52	0.11	0.49	0.09	1.00
V	0.03	0.30	0.28	0.37	2.39	0.27	0.19	0.10	0.74
L	0.02	0.46	0.65	0.35	1.38	0.34	0.18	1.00	0.49
I	0.07	0.15	0.19	0.52	1.65	0.36	0.17	0.26	0.55
M	0.02	0.14	3.26	0.40	1.18	0.73	0.56	0.30	0.85
K	0.06	0.94	0.11	0.30	0.58	0.08	0.31	0.03	0.60
R	0.03	0.17	0.05	0.23	0.59	0.11	0.16	0.02	0.41
H	0.36	0.33	2.04	0.99	1.06	0.74	0.28	0.12	0.62
F	0.02	0.09	1.00	0.95	1.51	0.95	0.11	1.66	0.55
Y	0.02	0.16	0.10	0.90	1.63	1.00	0.07	0.11	0.61
W	0.03	0.11	2.53	1.08	1.50	0.51	0.10	0.76	0.55
N	0.02	1.75	2.14	1.00	0.99	0.15	0.31	0.19	0.98
D	0.03	11.50	0.32	1.85	2.36	0.05	1.69	0.04	1.67
E	0.39	1.15	0.36	1.99	2.95	0.05	1.04	0.02	0.90
Q	1.00	1.00	0.42	0.62	1.53	0.21	0.61	0.12	0.83

Фиг. 5B

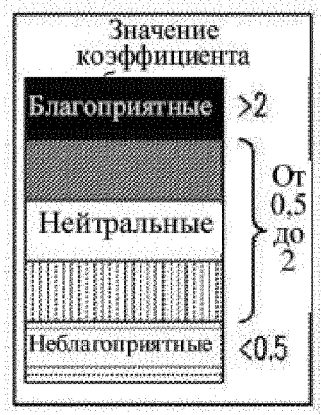


Антитело 13F3 I107T – замены HCDR1

Эмбрион.	_	_	_	_	_	_	Y	_	_	_
Исходн.	G	F	T	F	S	S	H	S	M	N
Нормализованный коэффициент обогащения										
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.07
P	0.00	0.00	0.26	0.00	0.77	0.03	0.18	0.00	0.05	0.08
G	1.03	0.02	1.13	0.01	3.01	3.02	0.01	0.11	0.02	3.22
A	0.08	0.00	1.45	0.01	1.05	4.21	0.01	1.52	0.03	3.85
C	0.22	0.02	1.06	0.02	0.62	0.05	0.12	3.11	0.22	0.04
S	0.07	0.02	1.20	0.02	1.03	1.03	0.01	1.03	0.02	5.16
T	0.02	0.00	1.03	0.02	0.16	0.99	0.01	0.33	0.21	1.60
V	0.04	0.03	2.24	0.02	0.06	5.08	0.01	0.03	0.33	1.15
L	0.18	0.07	0.94	0.04	0.29	0.02	0.07	0.30	0.29	0.04
I	0.03	0.15	1.97	0.02	0.14	0.25	0.02	0.27	0.33	0.09
M	0.11	0.02	0.87	0.04	1.04	0.02	0.02	1.31	1.03	0.07
K	0.08	0.00	0.81	0.00	1.34	0.10	0.00	0.67	0.16	0.11
R	0.10	0.03	0.73	0.00	1.91	0.02	0.06	1.45	0.14	0.06
H	0.18	0.00	0.54	0.00	0.79	0.06	1.03	0.00	0.04	0.46
F	0.06	1.03	0.64	1.03	0.17	0.06	0.02	0.02	0.03	0.01
Y	0.08	0.41	0.53	0.47	0.23	0.03	0.16	0.00	0.02	0.03
W	0.10	0.09	0.44	0.02	0.20	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04
N	0.25	0.02	0.62	0.02	2.03	0.00	0.22	0.18	0.00	1.03
D	0.07	0.00	1.16	0.01	1.82	0.01	0.03	0.04	0.03	1.20
E	0.18	0.00	1.86	0.02	0.98	1.14	0.02	0.10	0.03	0.16
Q	0.15	0.00	0.85	0.00	1.06	0.74	0.19	0.28	0.02	0.22

Фиг. 5C

Антитело 13F3 I107T – замены HCDR2



Эмбрион	S	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
Исходн	A	I	S	S	S	S	S	Y	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G
Нормализованный коэффициент обогащения																	
	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.13	0.00	0.51	0.25	0.14	0.15	0.00	0.22	0.52	0.00
P	0.12	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.04	0.12	1.03	1.64	1.30	1.07	1.21	0.80
G	0.88	0.37	0.05	0.07	0.07	0.29	0.33	0.04	0.02	1.98	0.63	1.76	0.85	1.60	1.32	0.97	1.07
A	1.07	2.00	0.02	0.00	0.05	0.33	0.82	0.02	0.08	1.39	0.41	1.07	0.96	1.19	1.21	1.06	1.11
C	0.52	0.33	0.11	2.11	0.22	0.46	0.90	0.10	0.05	0.42	0.49	0.93	1.25	0.68	0.85	1.13	1.05
S	2.05	0.57	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07	0.07	0.10	0.86	0.51	1.10	1.04	1.07	1.11	1.06	1.24
T	0.25	0.42	0.23	0.06	0.05	0.27	1.04	0.09	0.08	0.36	0.55	1.74	1.07	1.12	0.81	1.05	1.19
V	0.36	1.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.03	0.25	0.20	0.62	1.42	1.20	1.00	1.07	0.95	1.25
L	0.85	1.93	0.01	0.01	0.13	0.05	0.11	0.07	0.25	0.26	0.47	1.60	1.18	1.14	0.99	1.16	1.10
I	0.16	1.07	0.13	0.20	0.17	0.38	0.44	0.03	1.07	0.17	0.37	1.19	0.87	0.84	0.80	1.09	0.93
M	1.34	0.70	0.04	0.04	0.05	0.22	0.61	0.06	0.26	0.64	0.53	1.31	0.85	1.33	1.32	1.15	1.20
K	1.53	0.00	0.00	0.05	0.27	0.13	0.07	0.00	0.34	0.93	0.41	0.87	0.69	1.15	0.57	1.07	1.68
R	0.18	0.18	0.28	0.27	0.23	0.48	0.62	0.02	0.23	0.53	0.50	1.22	0.86	1.29	0.63	0.96	1.18
H	0.06	0.08	0.00	0.00	0.08	0.08	0.58	0.06	0.00	1.73	0.72	2.01	1.33	1.16	1.22	1.24	0.63
F	0.58	0.04	0.01	0.01	0.05	0.04	7.58	0.42	0.09	1.26	0.56	1.15	1.22	1.03	1.51	1.20	1.18
Y	0.27	0.03	0.00	0.02	0.03	0.02	10.48	1.07	0.21	1.07	1.07	1.19	1.69	1.22	0.95	1.16	1.12
W	0.03	0.05	0.04	0.03	0.05	0.03	9.01	0.20	0.18	0.24	0.50	1.07	0.96	1.00	0.75	1.07	1.22
N	0.36	1.45	0.07	0.13	0.11	0.22	0.47	0.03	0.11	1.78	0.53	1.78	1.14	0.99	0.80	1.03	1.23
D	1.07	0.03	0.00	0.03	0.01	0.00	0.02	0.02	0.04	0.42	0.39	1.25	1.07	1.49	0.80	0.68	1.29
E	0.07	0.97	0.02	0.00	0.00	0.03	0.02	0.02	0.03	0.69	0.32	1.28	1.09	1.61	1.33	0.97	0.96
Q	2.11	0.69	0.00	0.00	2.63	0.20	0.13	0.05	0.08	0.85	0.62	2.29	1.09	1.35	1.01	1.03	1.05

Фиг. 5D

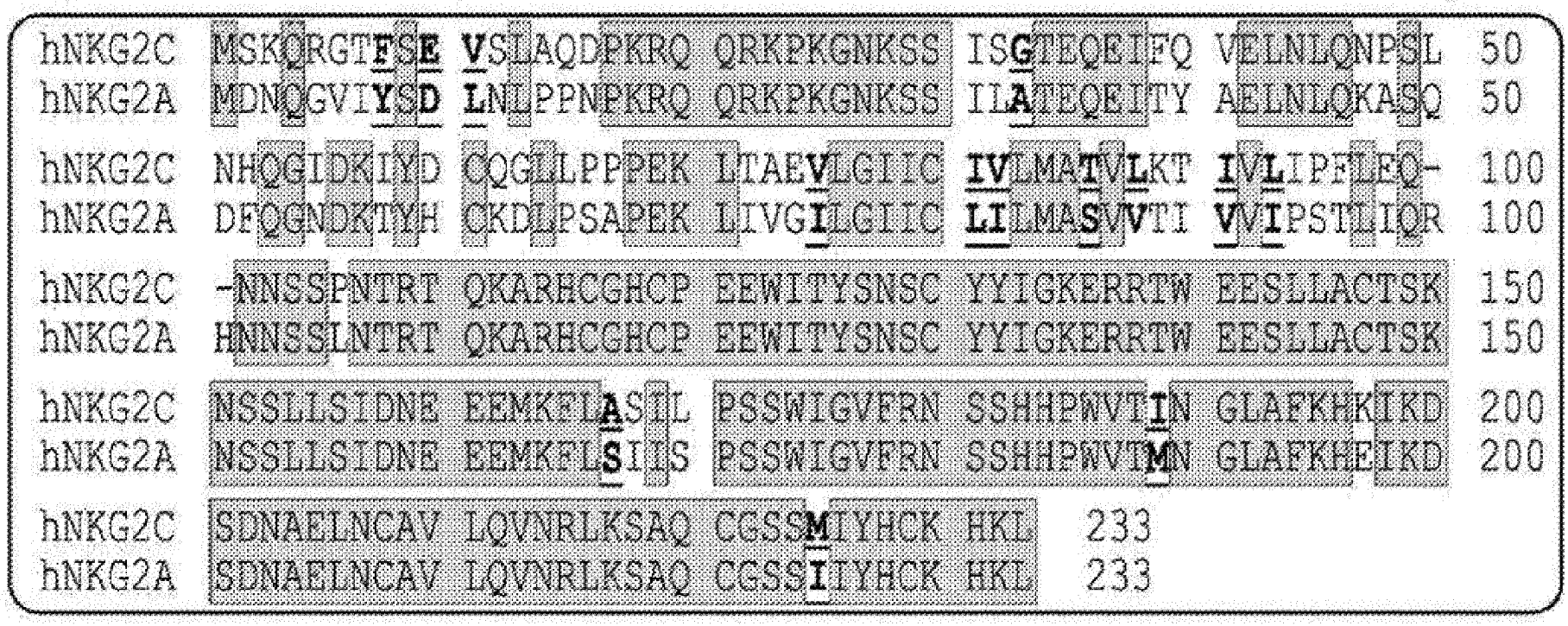


Антитело 13F3 I107T – замены HCDR3

Эмбрион.								
Исходн.	E	E	W	G	L	P	F	D
Нормализованный коэффициент обогащения								
	95	96	97	98	99	100	100a	101
*	0.00	0.70	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P	0.03	0.01	0.00	0.01	0.02	1.36	0.00	0.03
G	0.01	0.27	0.05	1.36	0.03	0.01	0.02	0.04
A	0.03	0.03	0.01	0.03	0.18	0.02	0.01	0.02
C	0.04	0.05	0.13	0.30	0.17	0.02	0.47	0.03
S	0.02	0.03	0.01	0.02	0.50	0.01	0.15	0.02
T	0.04	0.02	0.00	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03
V	0.04	0.09	0.01	0.07	0.02	0.02	0.16	0.03
L	0.06	0.03	0.14	0.04	1.36	0.04	0.37	0.02
I	0.04	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.13	0.01
M	0.03	0.93	0.02	0.03	0.11	0.01	0.09	0.02
K	0.14	0.10	0.02	0.02	0.02	0.00	0.03	0.03
R	0.02	0.01	0.07	0.04	0.02	0.01	0.02	0.03
H	0.03	0.03	0.02	0.02	1.19	0.02	0.02	0.03
F	0.03	0.06	0.02	0.04	0.21	0.01	1.36	0.03
Y	0.05	0.03	0.02	0.03	0.11	0.01	0.33	0.02
W	0.05	0.05	1.36	0.14	0.05	0.03	0.04	0.04
N	0.01	0.03	0.00	0.02	0.15	0.03	0.05	0.04
D	0.14	0.28	0.01	0.02	0.05	0.02	0.00	1.36
E	1.36	1.36	0.01	0.06	0.01	0.02	0.01	0.04
Q	0.01	0.03	0.00	0.01	0.14	0.00	0.00	0.03

Фиг. 5E

Выравнивание полноразмерных аминокислотных последовательностей человеческого NKG2C и человеческого NKG2A



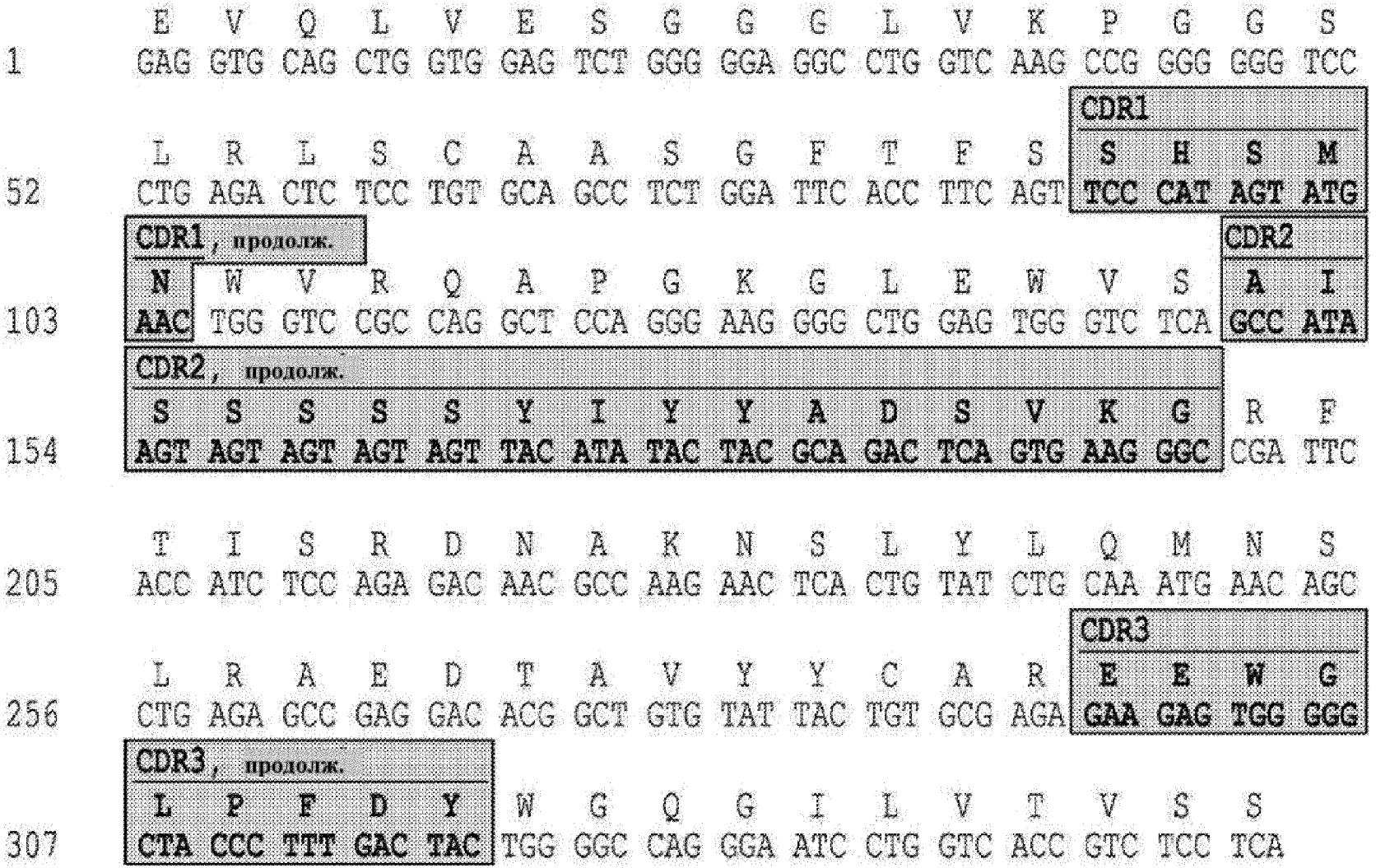
Консервативные (идентичные) аминокислотные остатки: 177 из 233 (76%)

Схожие аминокислотные остатки: 14 из 233 (6%)

Разные аминокислотные остатки: 42 из 233 (18%)

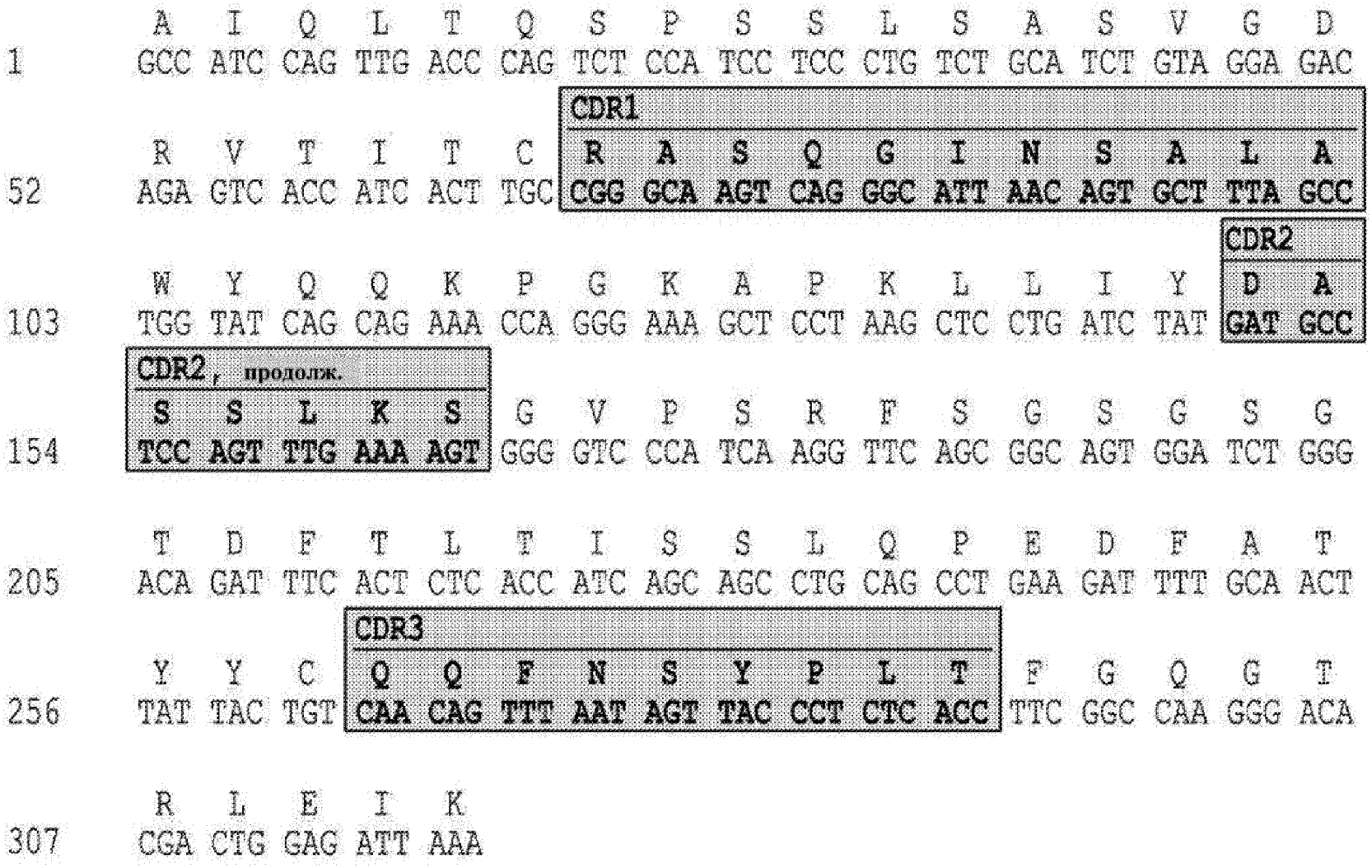
Фиг. 6

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела 13F3.A4 к NKG2A



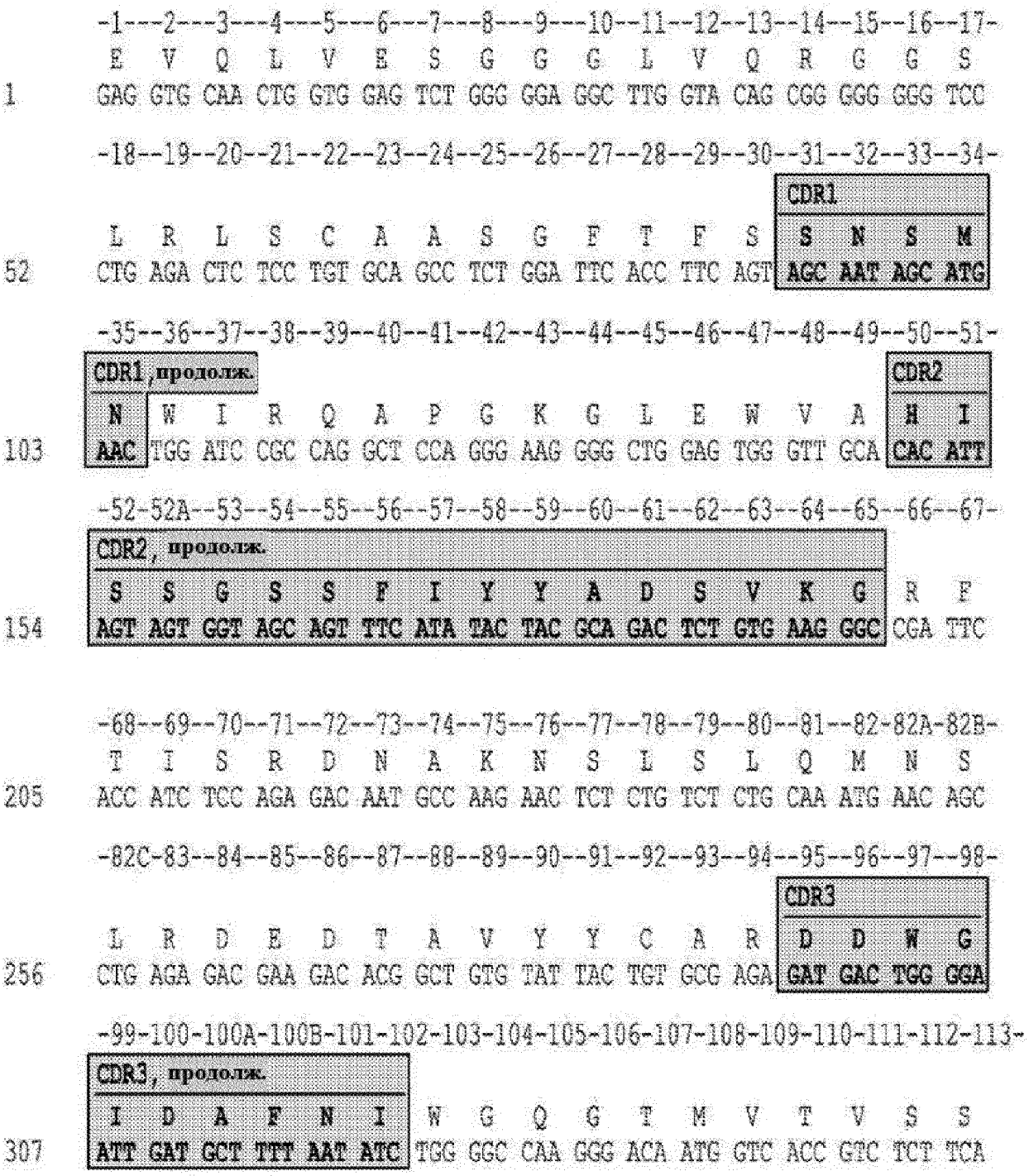
Фиг. 7A

Вариабельный участок легкой цепи антитела 13F3.A4 к NKG2A



Фиг. 7B

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела 2G6.C2 к NKG2A



Фиг. 8A

Вариабельный участок легкой цепи антитела 2G6.C2 к NKG2A

```
        -1---2---3---4---5---6---7---8---9---10--11--12--13--14--15--16--17-
         E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1       GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

        -18--19--20--21--22--23--24--25--26--27--28--29--30--31--32--33--34-
                                 CDR1
         R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   L   A
52      AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TCC TTA GCC

        -35--36--37--38--39--40--41--42--43--44--45--46--47--48--49--50--51-
                                                                 CDR2
         W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103     TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

        -52--53--54--55--56--57--58--59--60--61--62--63--64--65--66--67--68-
        CDR2, продолж.
         S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154     TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

        -69--70--71--72--73--74--75--76--77--78--79--80--81--82--83--84--85-
         T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205     ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

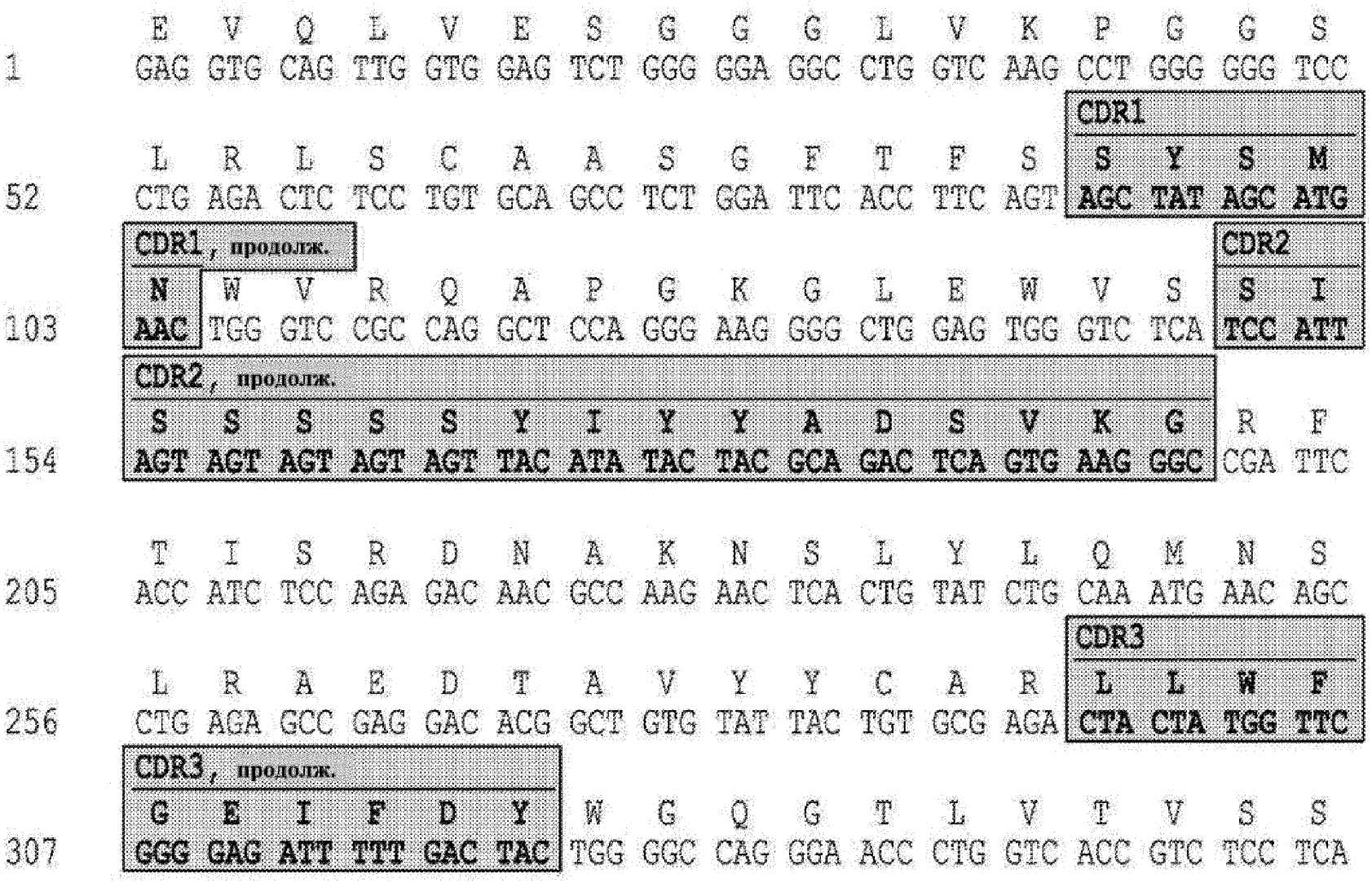
        -86--87--88--89--90--91--92--93--94--95--96--97--98--99-100-101-102-
                         CDR3
         Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   I   F   T   F   G   P   G   T
256     TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG ATA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC

        103-104-105-106-107-

         K   V   D   I   K
307     AAA GTG GAT ATC AAA
```

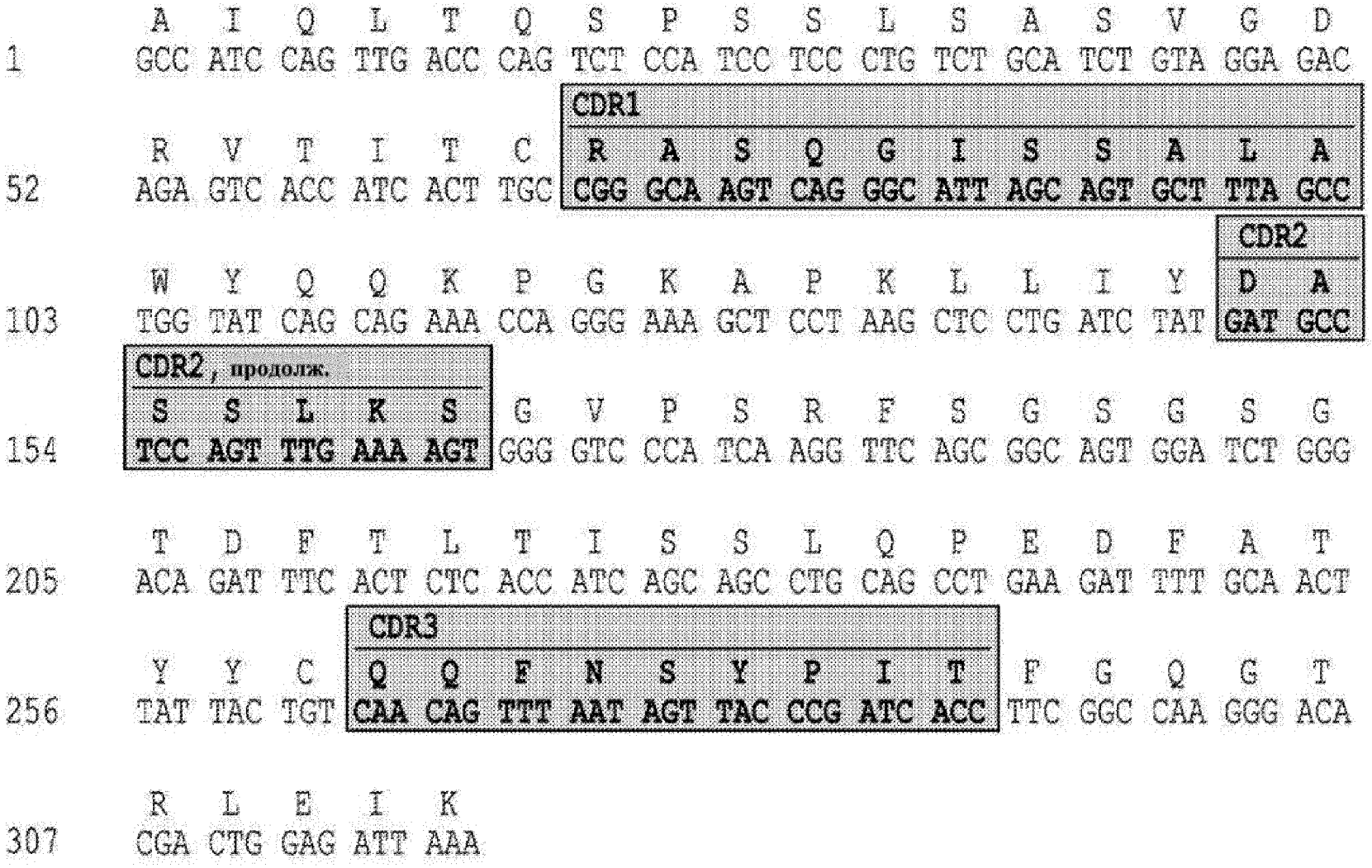
Фиг. 8B

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела 11H9.A1 к NKG2A



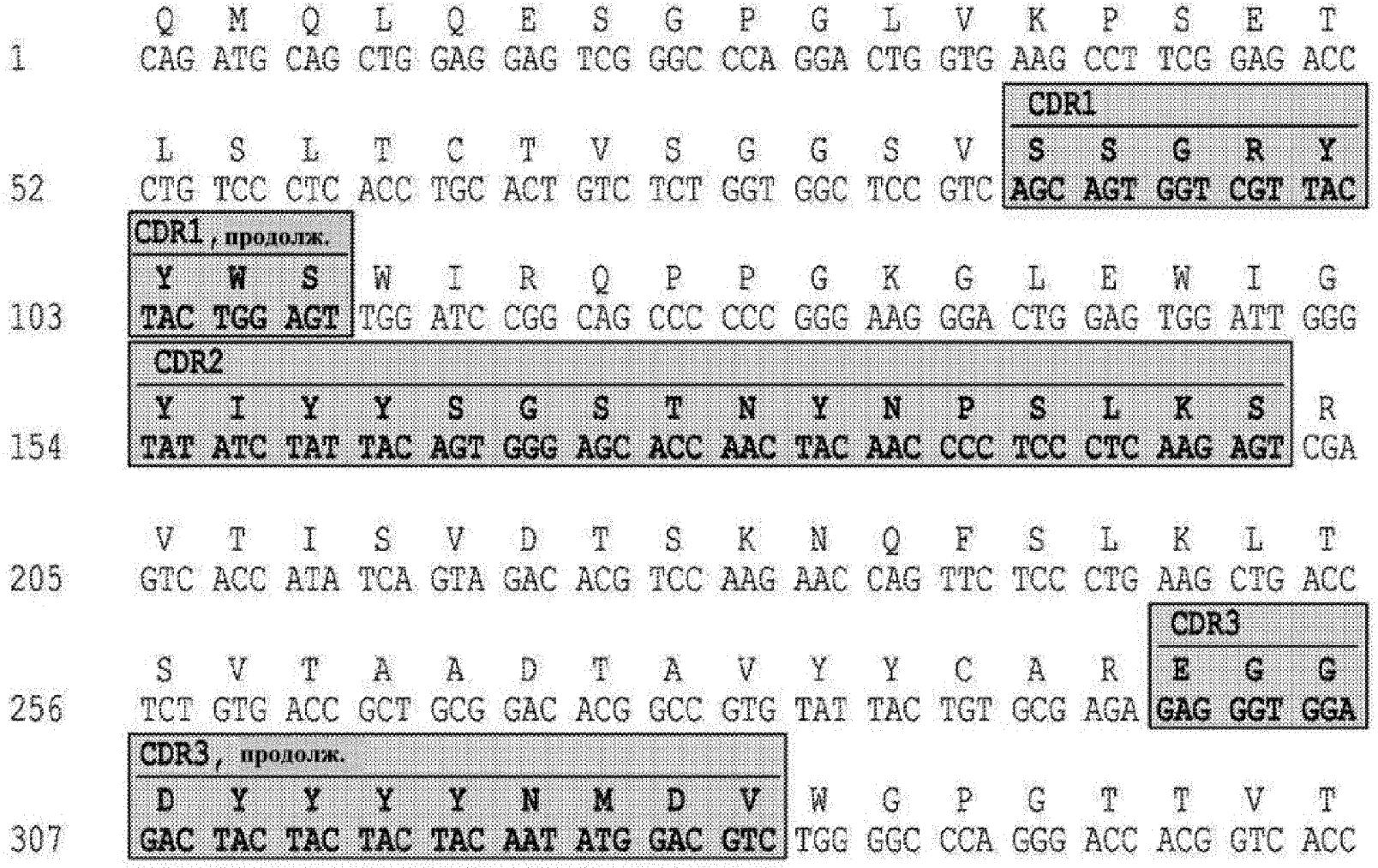
Фиг. 9A

Вариабельный участок легкой цепи антитела 11H9.A1 к NKG2A



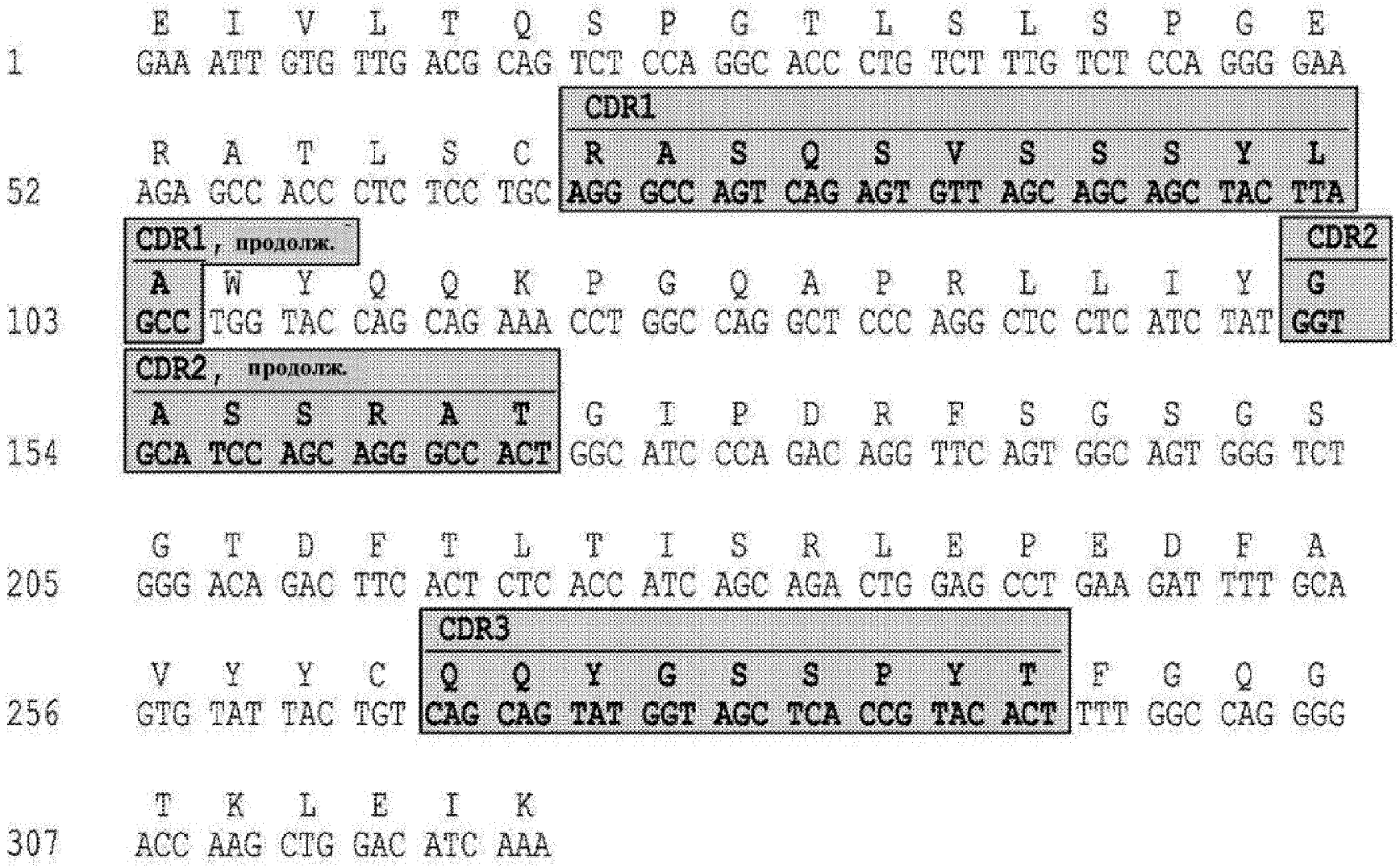
Фиг. 9B

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела 4G5.D1 к NKG2A



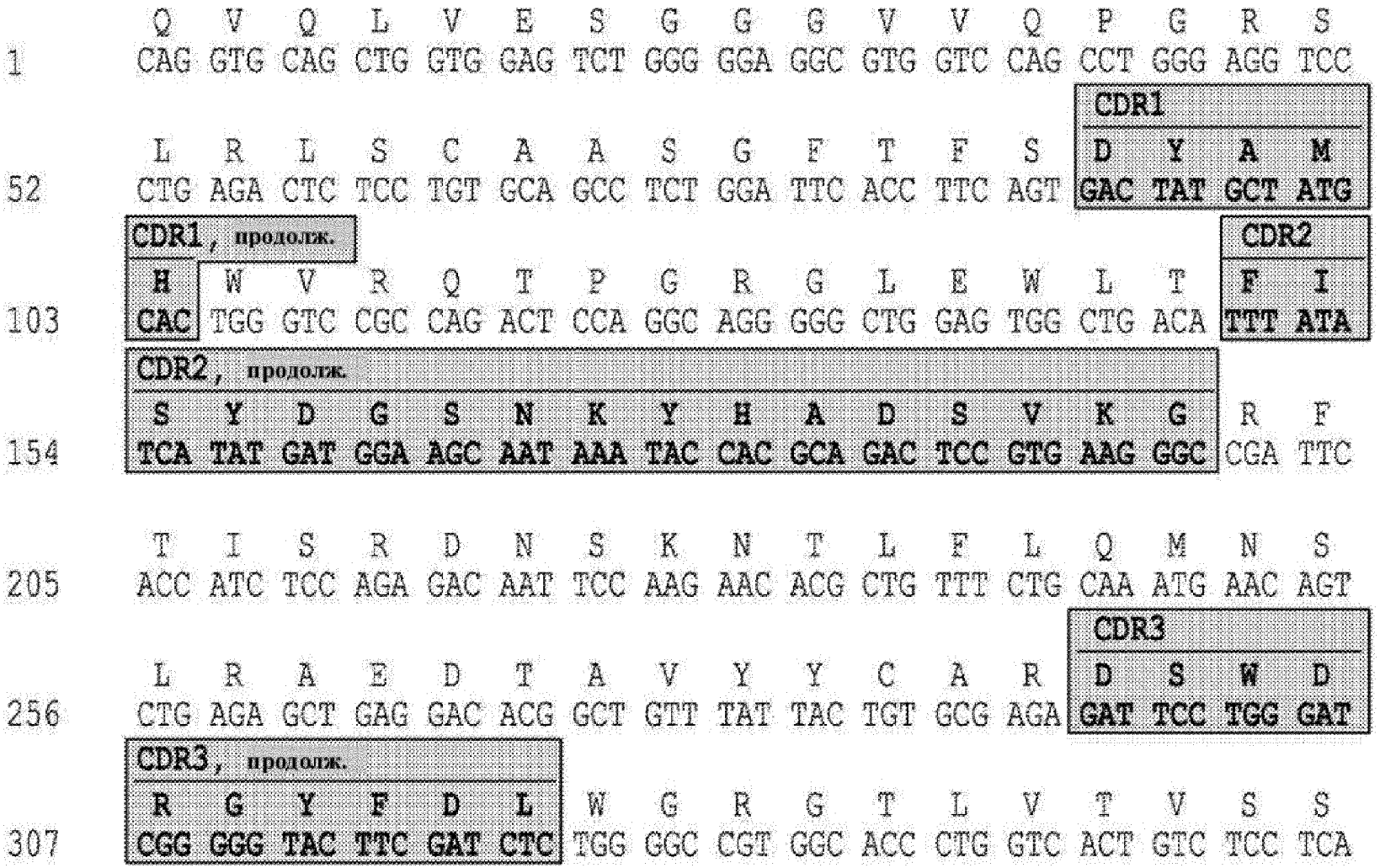
Фиг. 10A

Вариабельный участок легкой цепи антитела 4G5.D1 к NKG2A



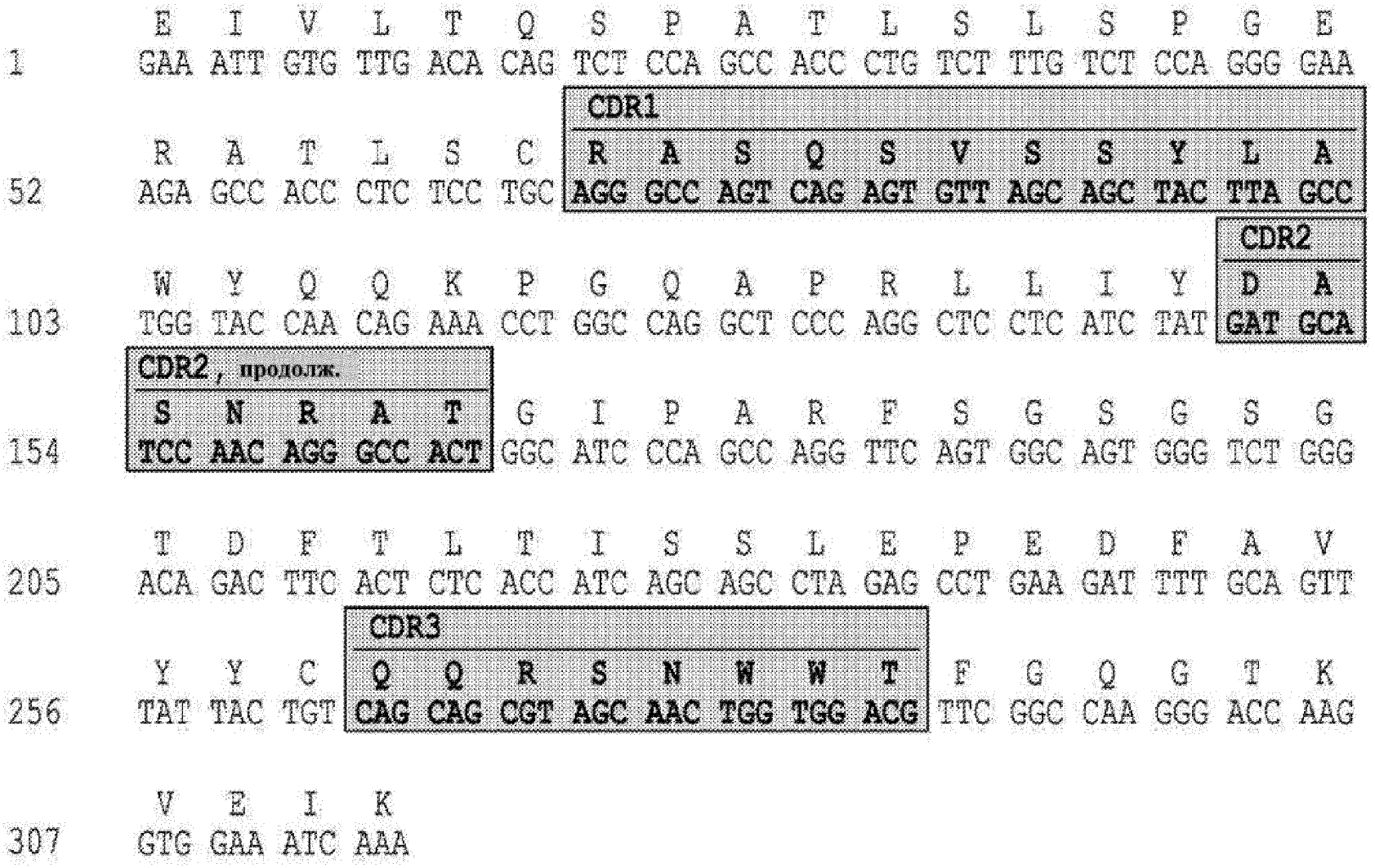
Фиг. 10B

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела 1G5.B2 к NKG2A



Фиг. 11A

Вариабельный участок легкой цепи антитела 1G5.B2 к NKG2A

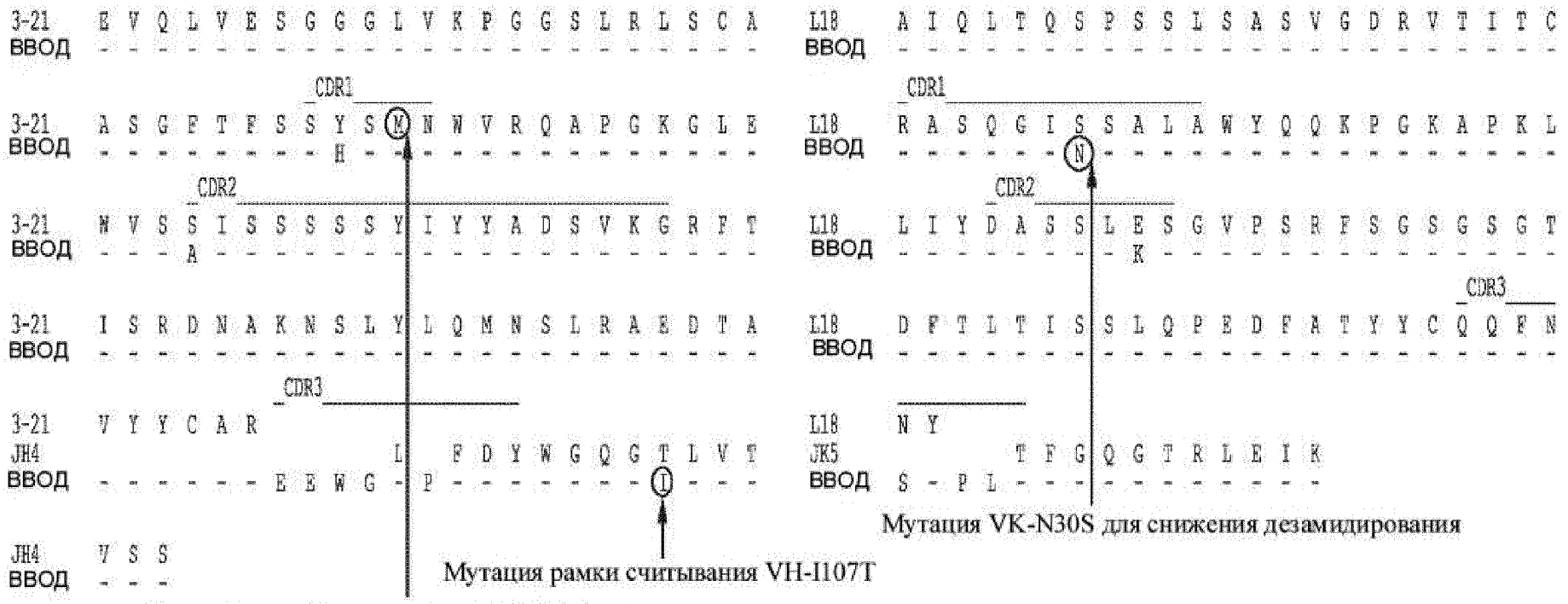


Фиг. 11B

Антитело 13F3.A4 к NKG2A – оцененные библиотеки последовательностей

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	RF	TGL	VBASEENTRY
V-СЕГМЕНТ	VH3	3-21		Y10	TGL-Y10
D-СЕГМЕНТ	UNDETERMINED				.
J-СЕГМЕНТ	JH4	4			JH4b
ВВОД	13F3.A4-VH1				

	СЕМЕЙСТВО	ЛОКУС	TGL	VBASEENTRY
V-СЕГМЕНТ	VK1	L18		Va''+
J-СЕГМЕНТ	JK5	5		JK5
ВВОД	13F3.A4-VK1			



Потенциальный риск окисления M34: без риска:

Фиг. 12

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АНТИТЕЛА NKG2A.9

Последовательность легкой цепи

CDR1 CDR2 CDR3

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGIS**S**SALA**WYQQKPGKAPKLLIY**DASSLKS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQFNSYPLT**FGQGTRLEIK **VL**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **CL**

Последовательность тяжелой цепи

CDR1 CDR2 CDR3

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**SHSMN**WVRQAPGKGLEWVS**AISSSSSYIYYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**EEWGLPFDY** **VH**

WGQGO**LVTVSS**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC **CH**

PAPE**AA**GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**NST**YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(K)

Легенда	
Жирный подчеркнутый	CDR-участки
O	Две мутации, внесенные в последовательность VL (N30S) и последовательность VH (I107T) гибридомы 13F3
NST	Мотив N-гликозилирования
(K)	K был удален из зрелой последовательности
Жирный курсив	Три мутации G1.3F (L234A, L235E и G237A), внесенные в Fc-участок g1f

Фиг. 13

Аминокислотная последовательность антитела NKG2A.9

Легкая цепь

AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLKSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Тяжелая цепь

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA ISSSSSYIYY
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG

Фиг. 14

Аминокислотная последовательность антитела NKG2A.11

Легкая цепь

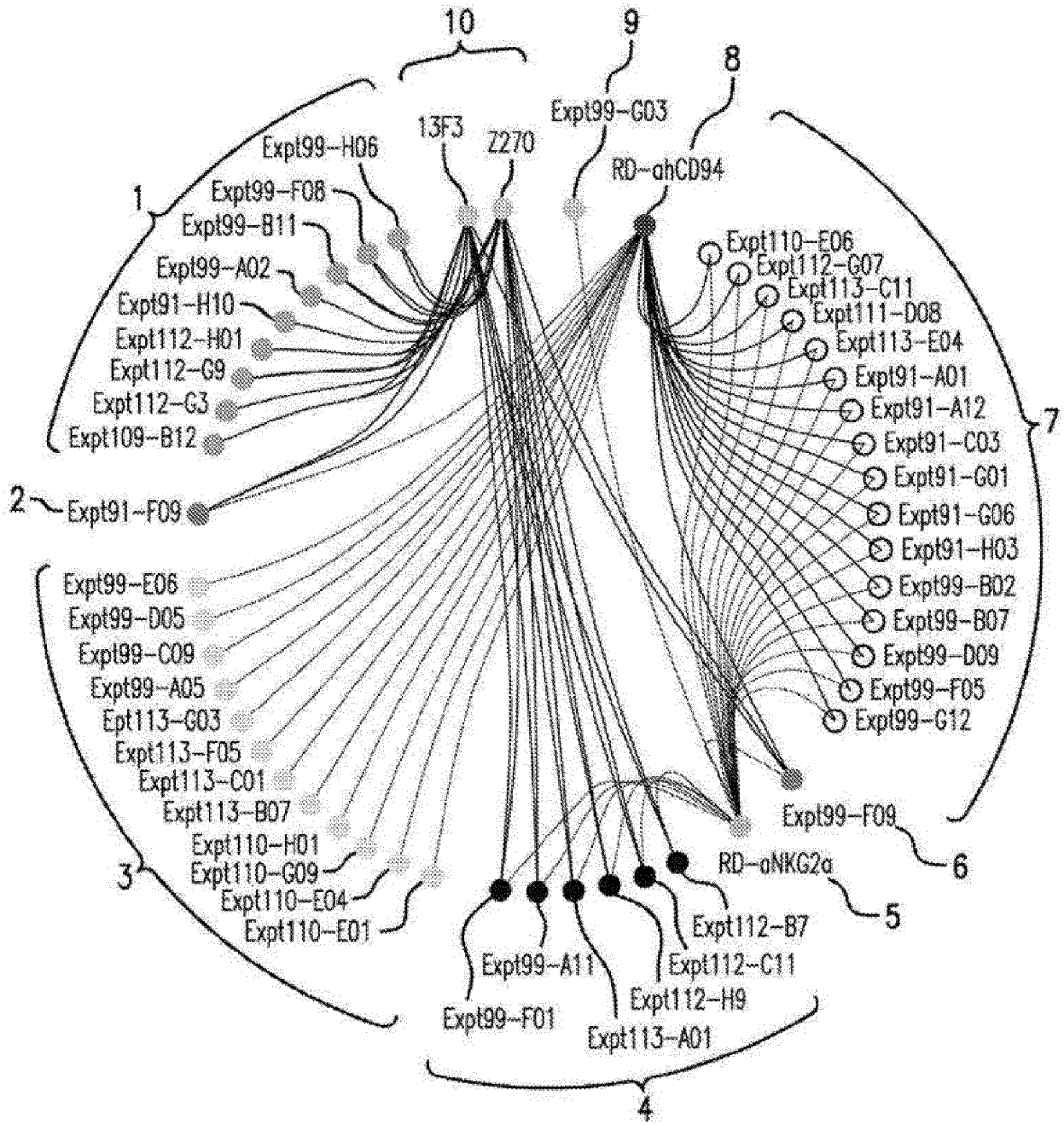
AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLKSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Тяжелая цепь

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA ISSSSSYIYY
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG

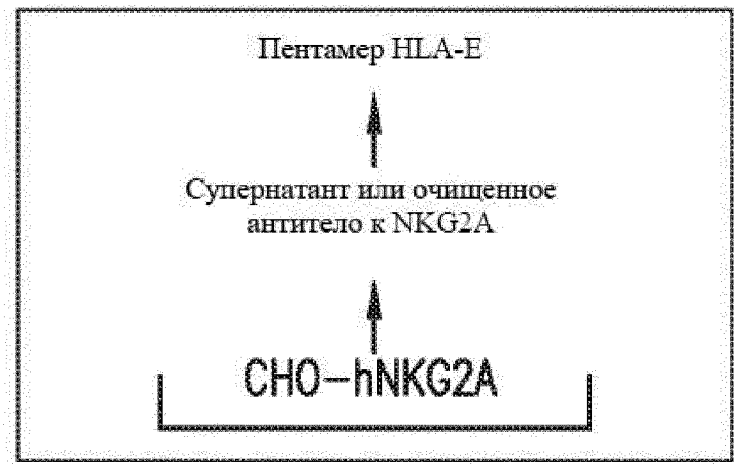
Фиг. 15

Группирование эпитопов антител, полученных с помощью клонирования отдельных B-клеток по отношению к контрольным антителам

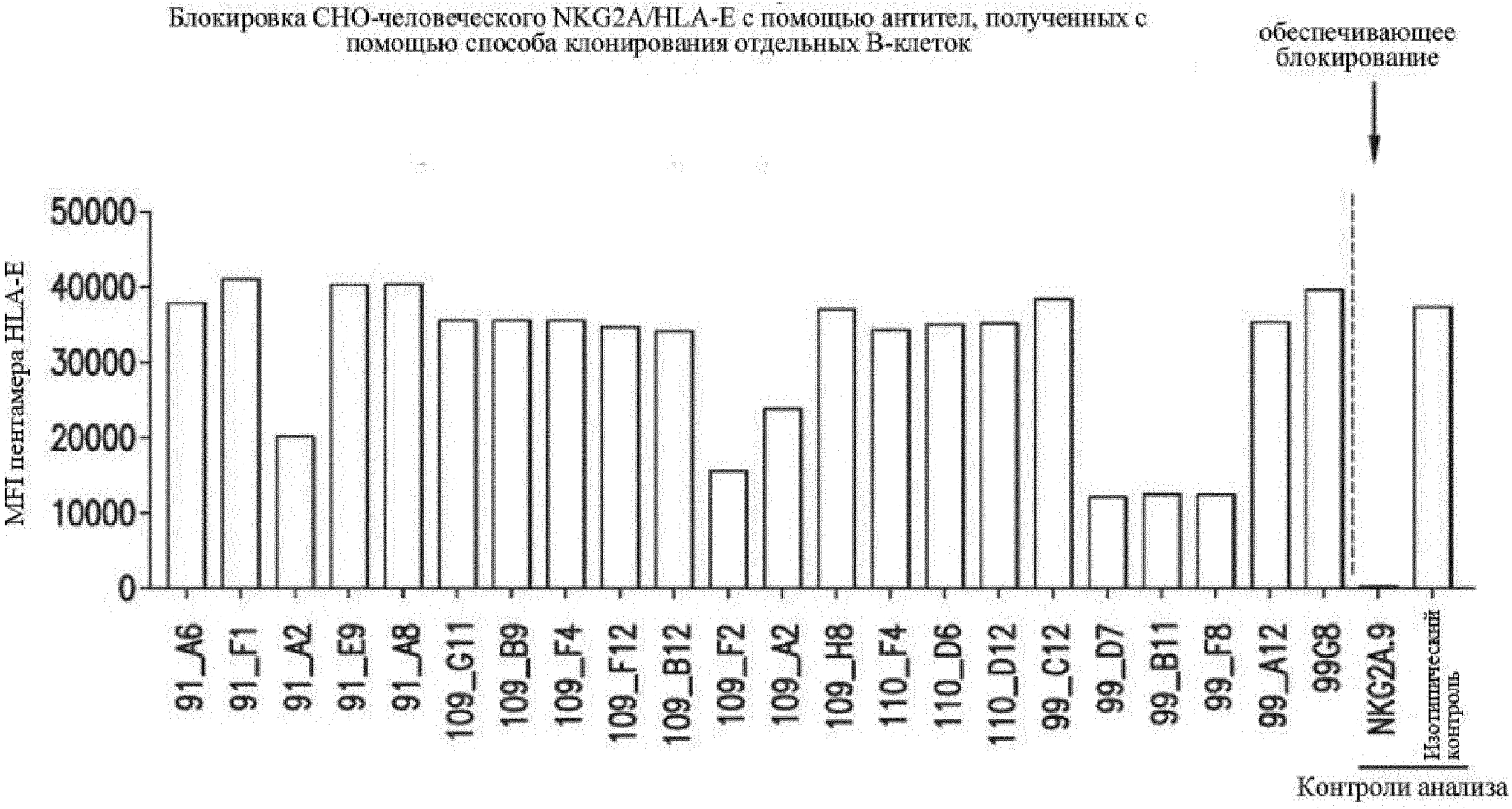


Фиг. 16

Блокировка CHO-человеческого NKG2A/HLA-E с помощью антител, полученных с помощью способа клонирования отдельных B-клеток

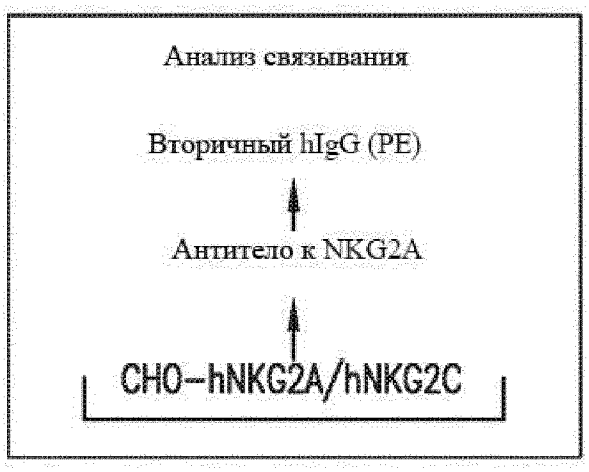


Фиг. 17A

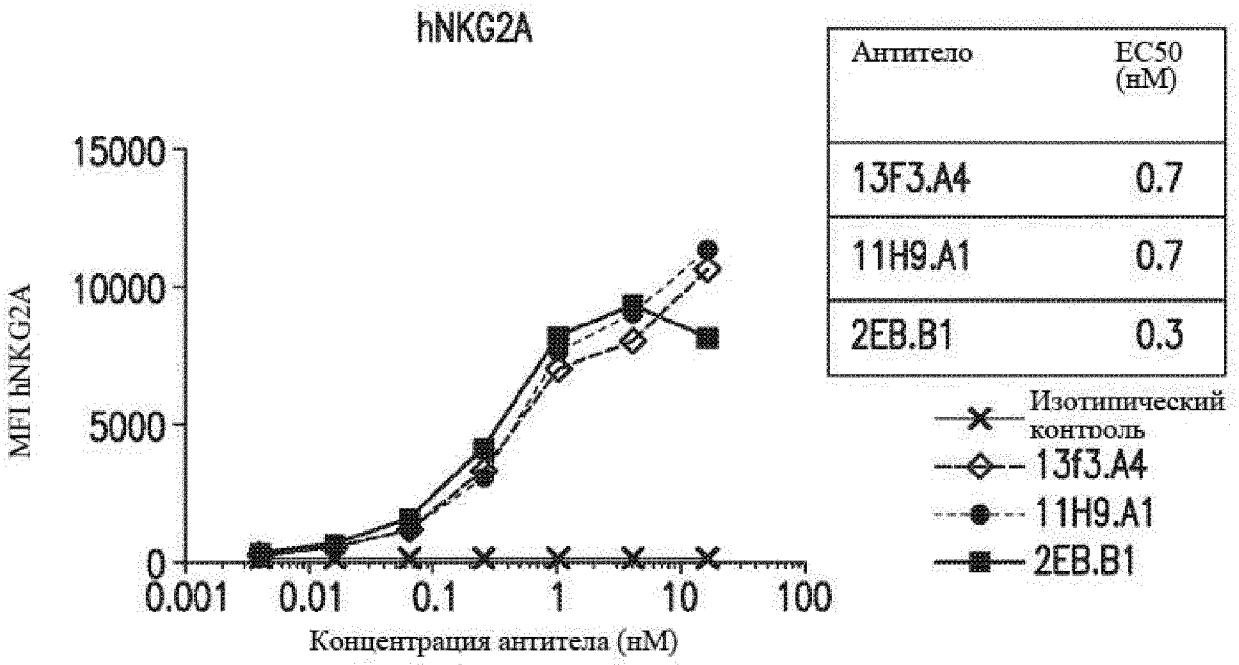

Блокировка CHO-человеческого NKG2A/HLA-E с помощью антител, полученных с помощью способа клонирования отдельных B-клеток
обеспечивающее блокирование
MFI пентамера HLA-E
50000
40000
30000
20000
10000
0
91_A6
91_F1
91_A2
91_E9
91_A8
109_G11
109_B9
109_F4
109_F12
109_B12
109_F2
109_A2
109_H8
110_F4
110_D6
110_D12
99_C12
99_D7
99_B11
99_F8
99_A12
99G8
NKG2A.9
Изотипический контроль
Контроли анализа

Фиг. 17B

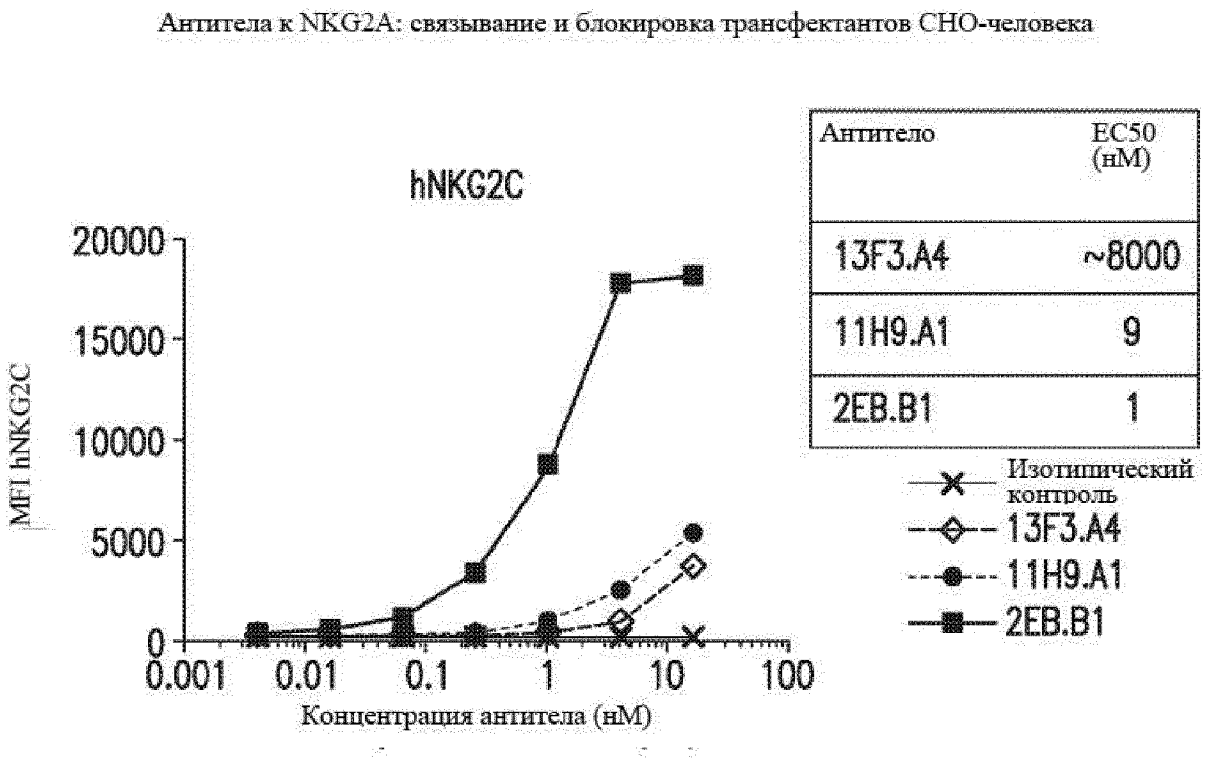
Антитела к NKG2A: связывание и блокировка трансфектантов CHO-человека



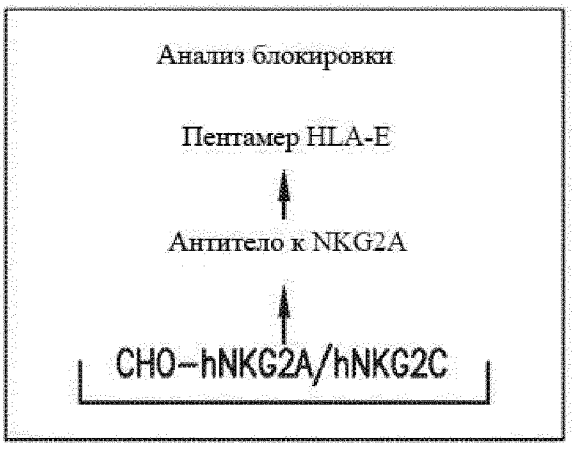
Фиг. 18A



Фиг. 18B

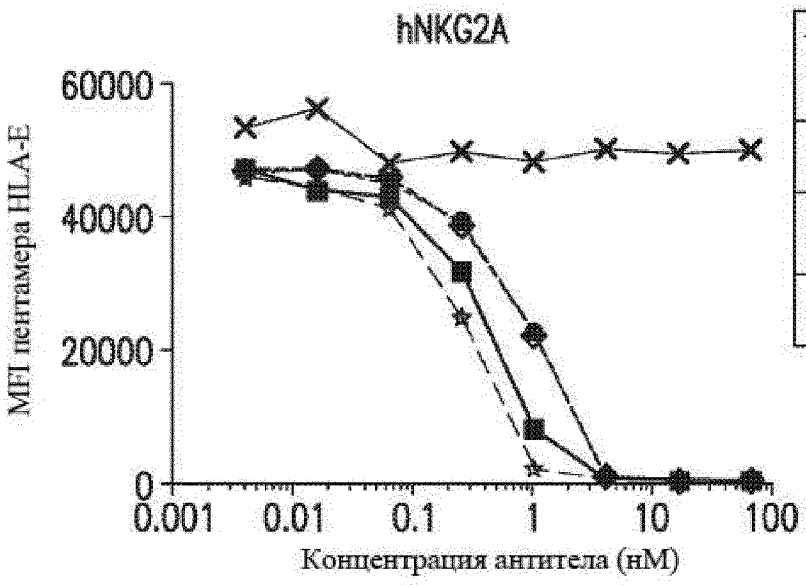


Фиг. 18C



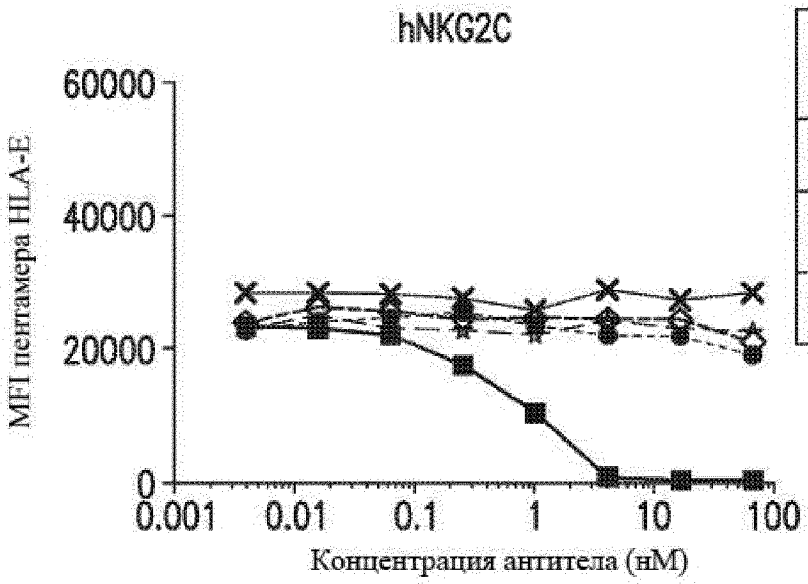
Фиг. 18D

Антитела к NKG2A: связывание и блокировка трансфектантов CHO-человека



Антитело	IC50 (нМ)
13F3.A4	0.9
11H9.A1	1
2EB.B1	0.4

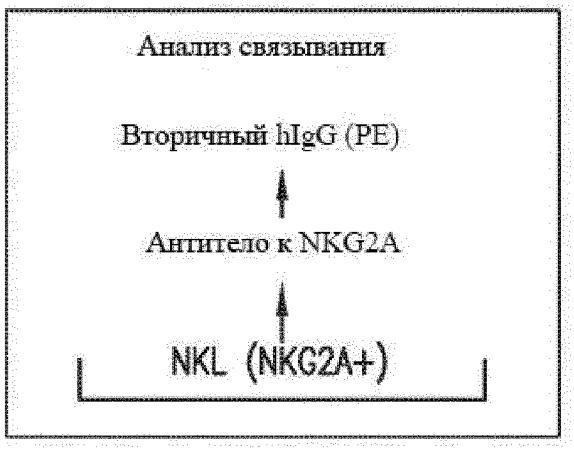
Фиг. 18E



Антитело	IC50 (нМ)
13F3.A4	~5000
11H9.A1	54
2EB.B1	0.8

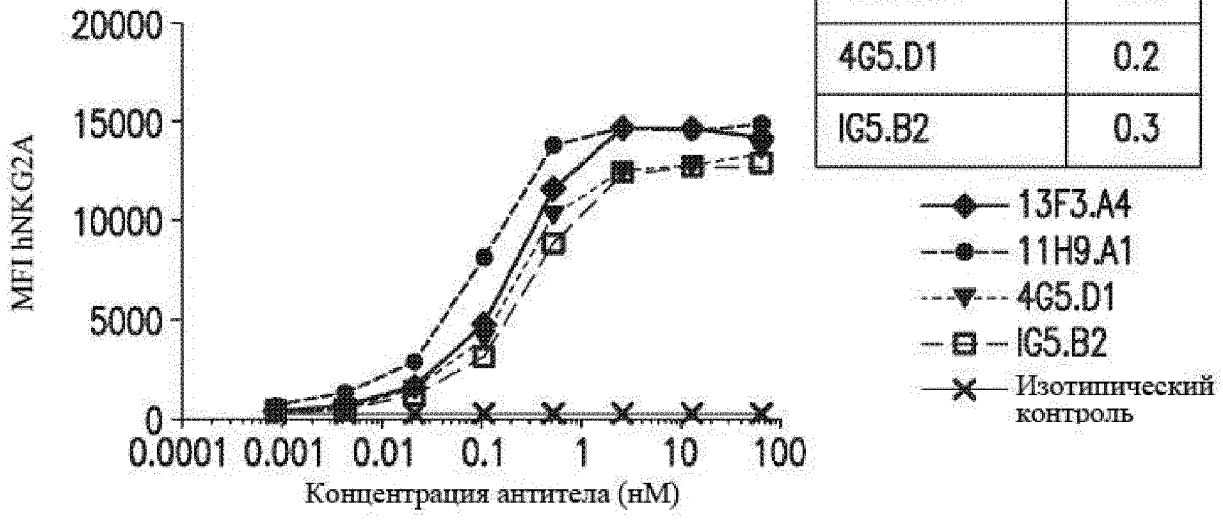
Фиг. 18F

Антитела к NKG2A: связывание и блокировка линии NKG2A+ клеток-натуральных киллеров (NKL) человека



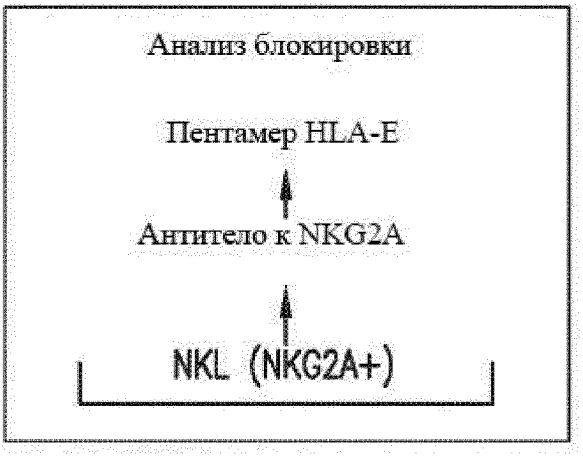
Фиг. 19A

Антитело	EC50 (нМ)
13F3.A4	0.2
11H9.A1	0.1
4G5.D1	0.2
IG5.B2	0.3



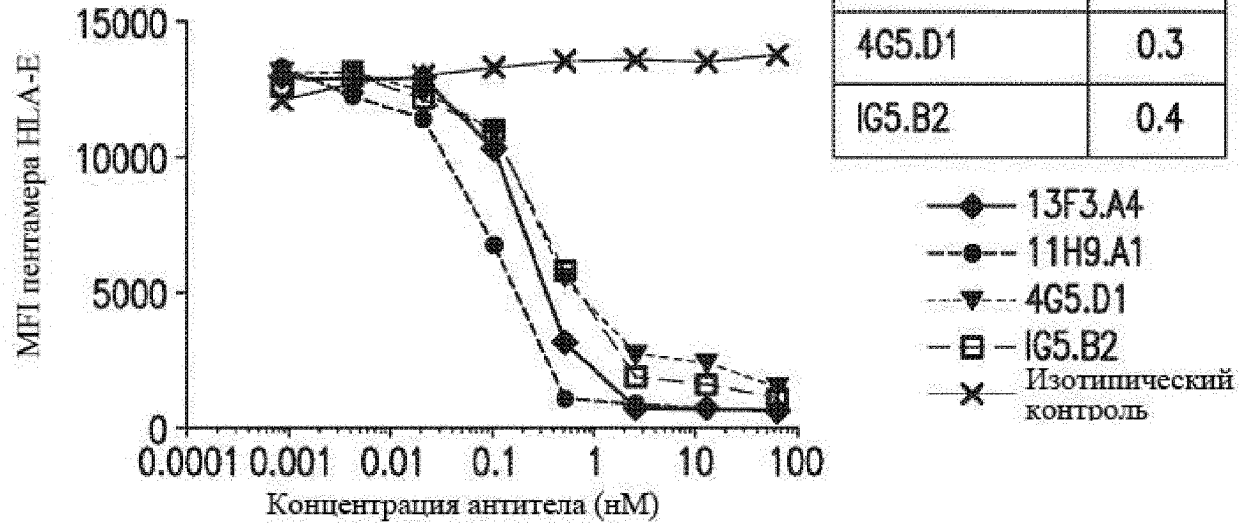
Фиг. 19B

Антитела к NKG2A: связывание и блокировка линии NKG2A+ клеток-натуральных киллеров (NKL) человека



Фиг. 19C

Антитело	IC50 (нМ)
13F3.A4	0.2
11H9.A1	0.1
4G5.D1	0.3
IG5.B2	0.4



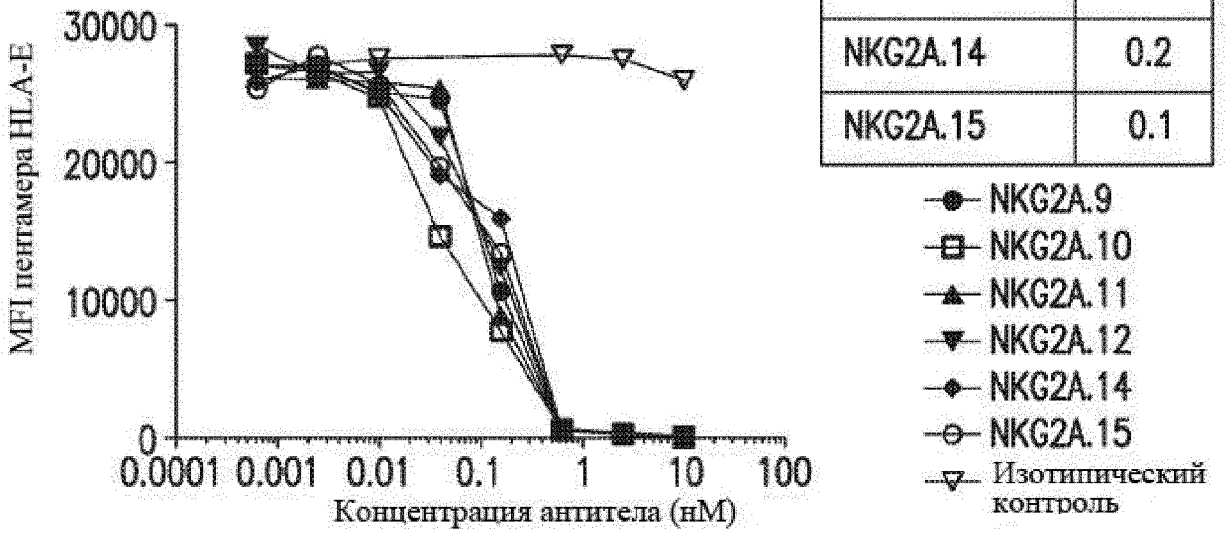
Фиг. 19D

Способность антител к NKG2A блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E в hNKG2A-экспрессирующих клетках CHO



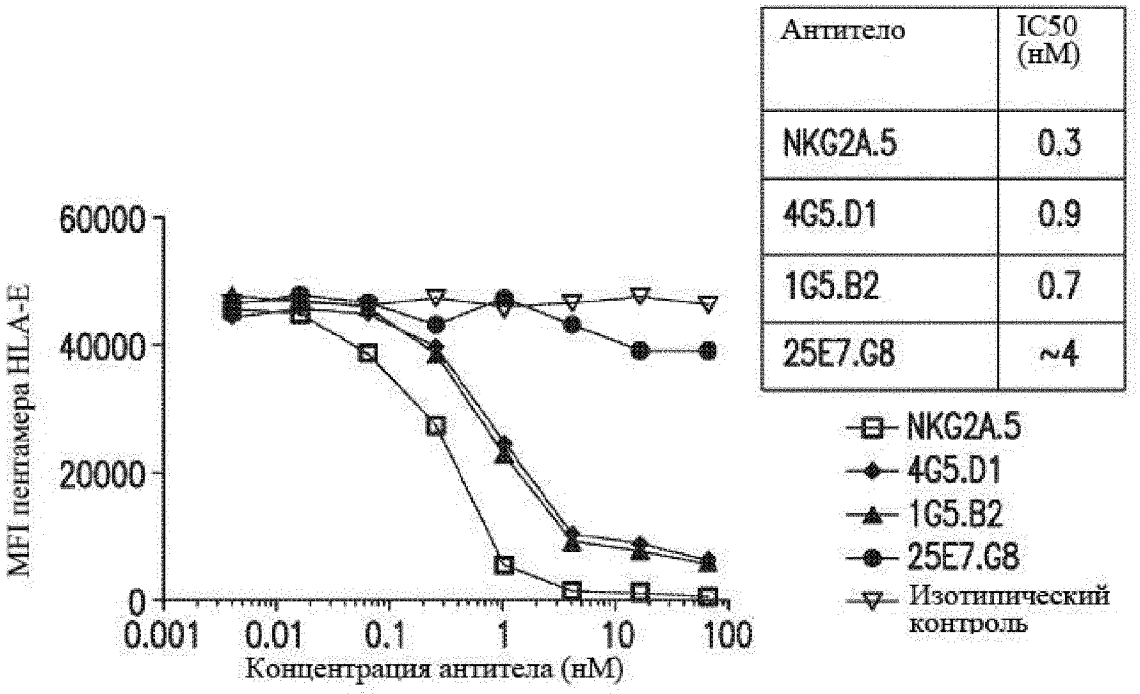
Фиг. 20A

Антитело	IC50 (нМ)
NKG2A.9	0.1
NKG2A.10	0.05
NKG2A.11	0.1
NKG2A.12	0.1
NKG2A.14	0.2
NKG2A.15	0.1



Фиг. 20B

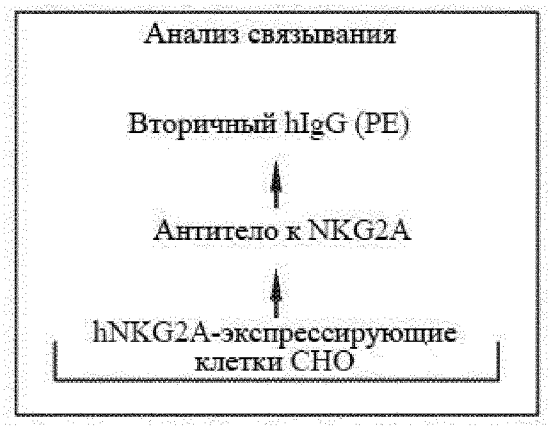
Способность антител к NKG2A блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E в hNKG2A-экспрессирующих клетках CHO



Антитело	IC50 (нМ)
NKG2A.5	0.3
4G5.D1	0.9
1G5.B2	0.7
25E7.G8	~4

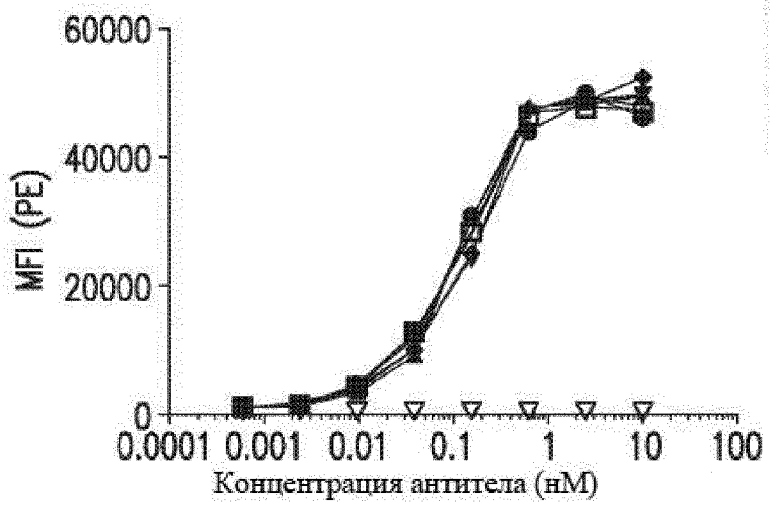
Фиг. 20C

Связывание антител к NKG2A с hNKG2A-экспрессирующими клетками CHO



Фиг. 21A

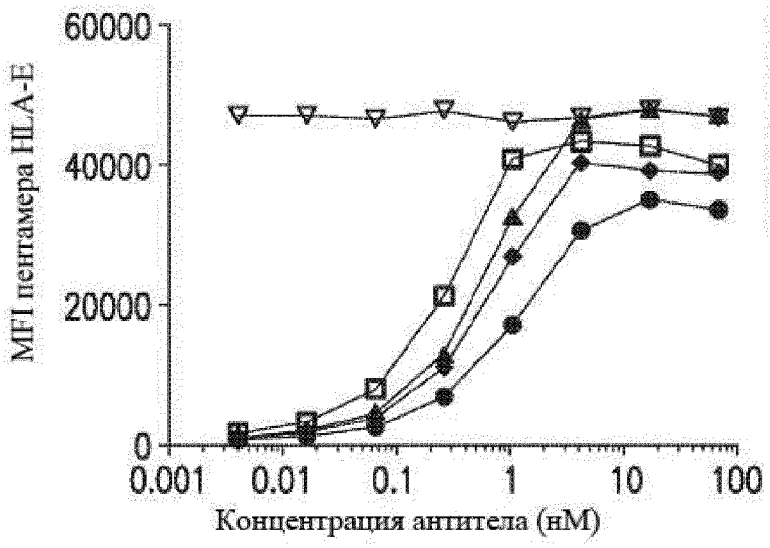
Связывание антител к NKG2A с hNKG2A-экспрессирующими клетками CHO



Антитело	EC50 (нМ)
NKG2A.9	0.1
NKG2A.10	0.1
NKG2A.11	0.1
NKG2A.12	0.2
NKG2A.14	0.1
NKG2A.15	0.1

NKG2A.9
NKG2A.10
NKG2A.11
NKG2A.12
NKG2A.14
NKG2A.15
Изотипический контроль

Фиг. 21B



Антитело	EC50 (нМ)
NKG2A.5	0.3
4G5.D1	0.6
1G5.B2	0.6

NKG2A.5
4G5.D1
1G5.B2
25E7.G8
Изотипический контроль

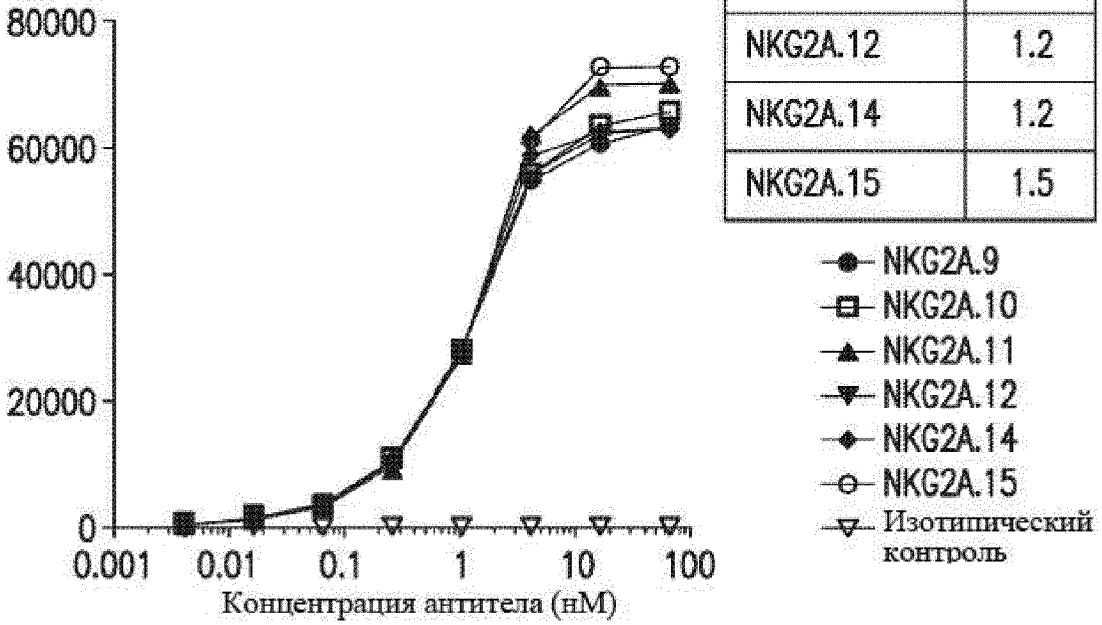
Фиг. 21C

Связывание антител к NKG2A с экспрессирующими NKG2A яванского макака клетками CHO



Фиг. 22A

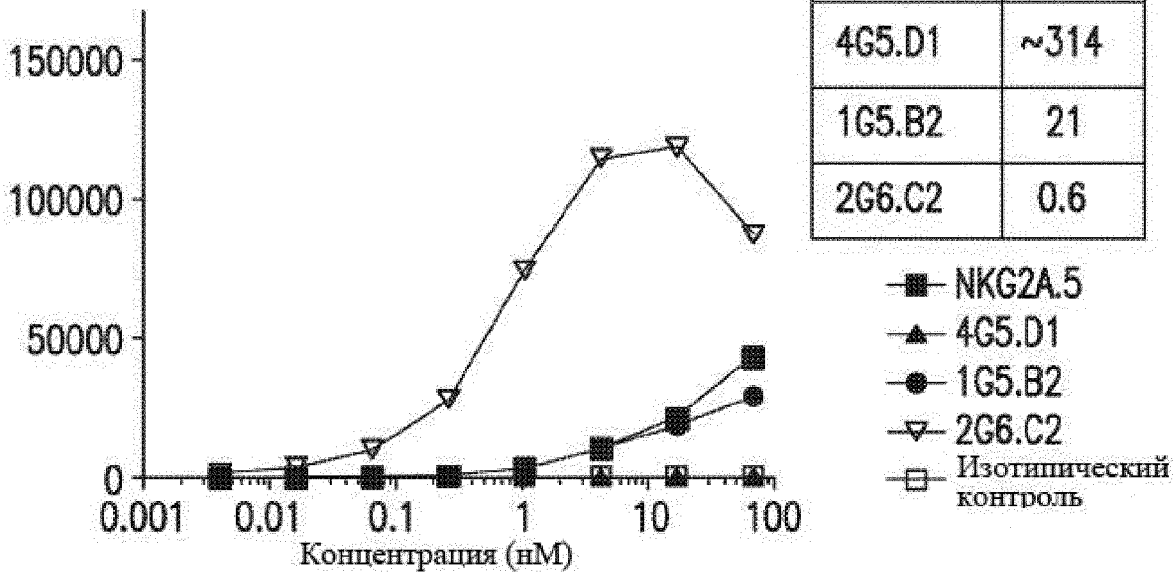
Антитело	EC50 (нМ)
NKG2A.9	1.2
NKG2A.10	1.3
NKG2A.11	1.4
NKG2A.12	1.2
NKG2A.14	1.2
NKG2A.15	1.5



Фиг. 22B

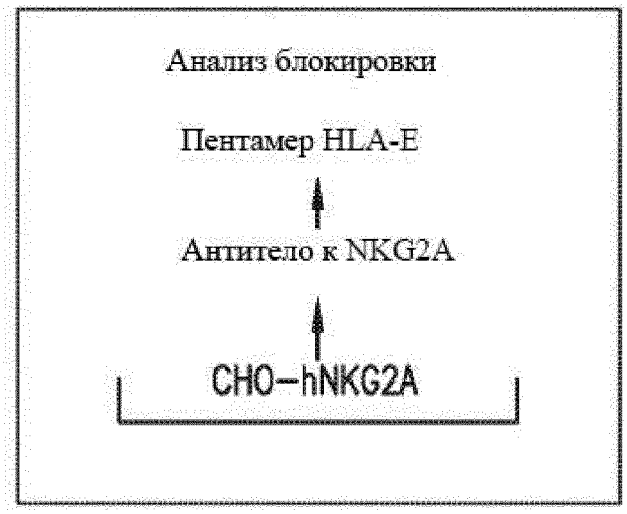
Связывание антител к NKG2A с экспрессирующими NKG2A яванского макака клетками CHO

Антитело	EC50 (нМ)
NKG2A.5	172
4G5.D1	~314
1G5.B2	21
2G6.C2	0.6



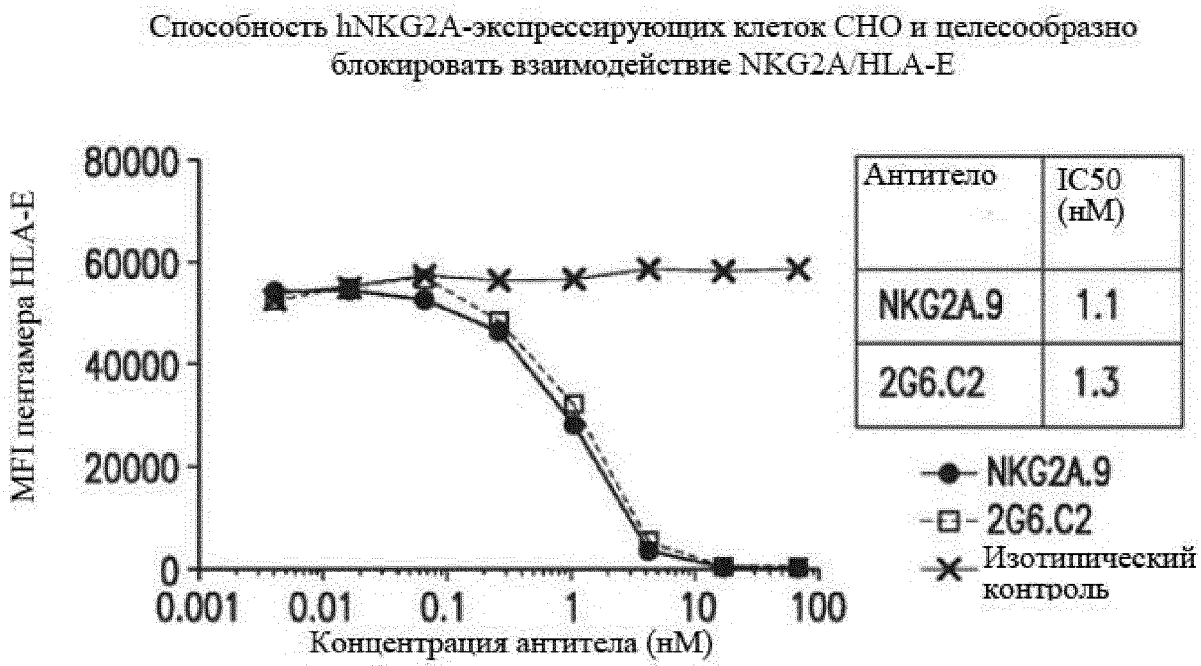
Фиг. 22C

Способность антитела 2G6.C2 связывать экспрессирующие NKG2A человека клетки CHO и блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E

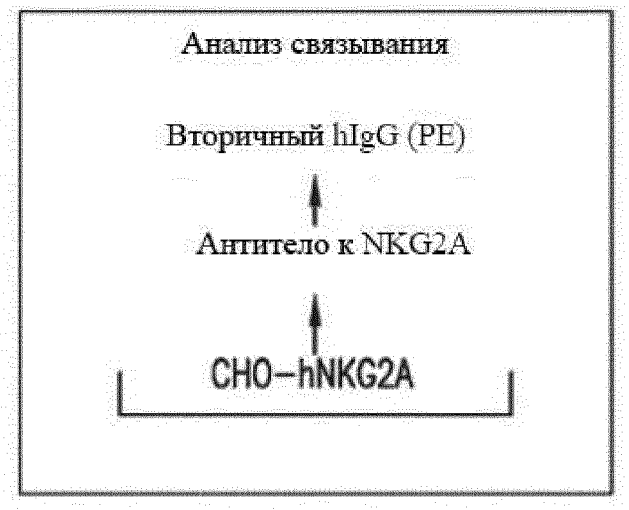


Фиг. 23A

Способность антитела 2G6.C2 связывать экспрессирующие NKG2A человека клетки CHO и блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E

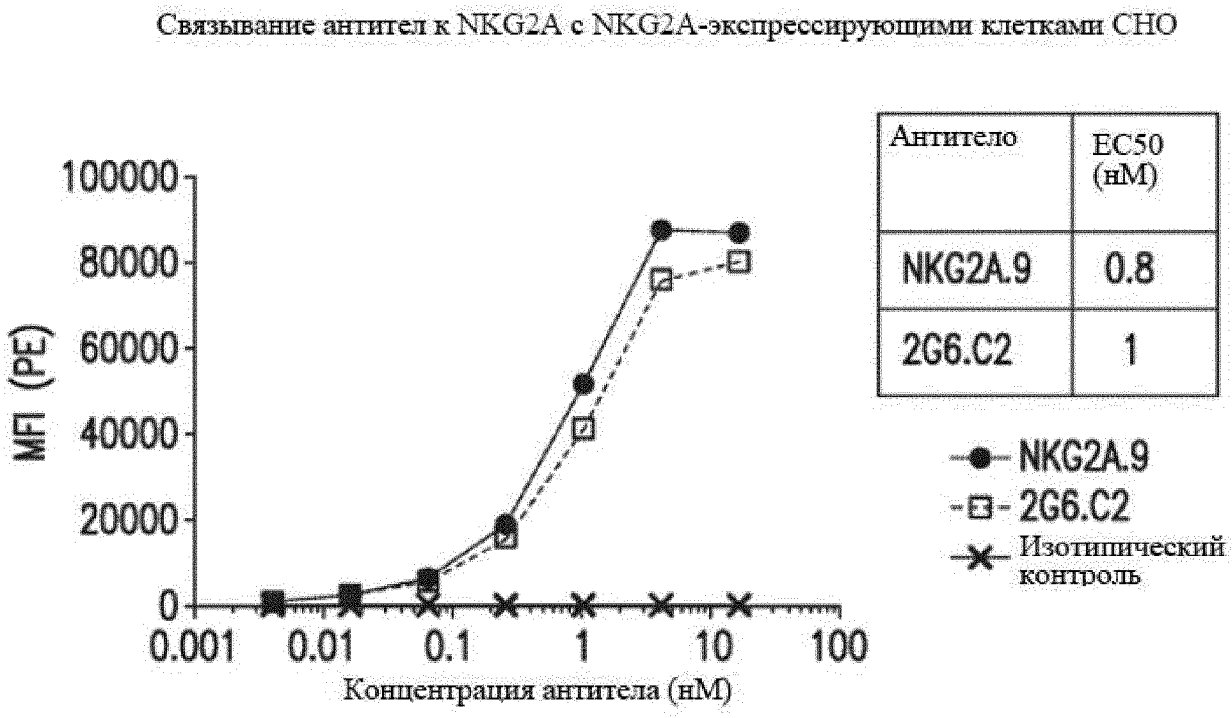


Фиг. 23B



Фиг. 23C

Способность антитела 2G6.C2 связывать экспрессирующие NKG2A человека клетки CHO и блокировать взаимодействие NKG2A/HLA-E

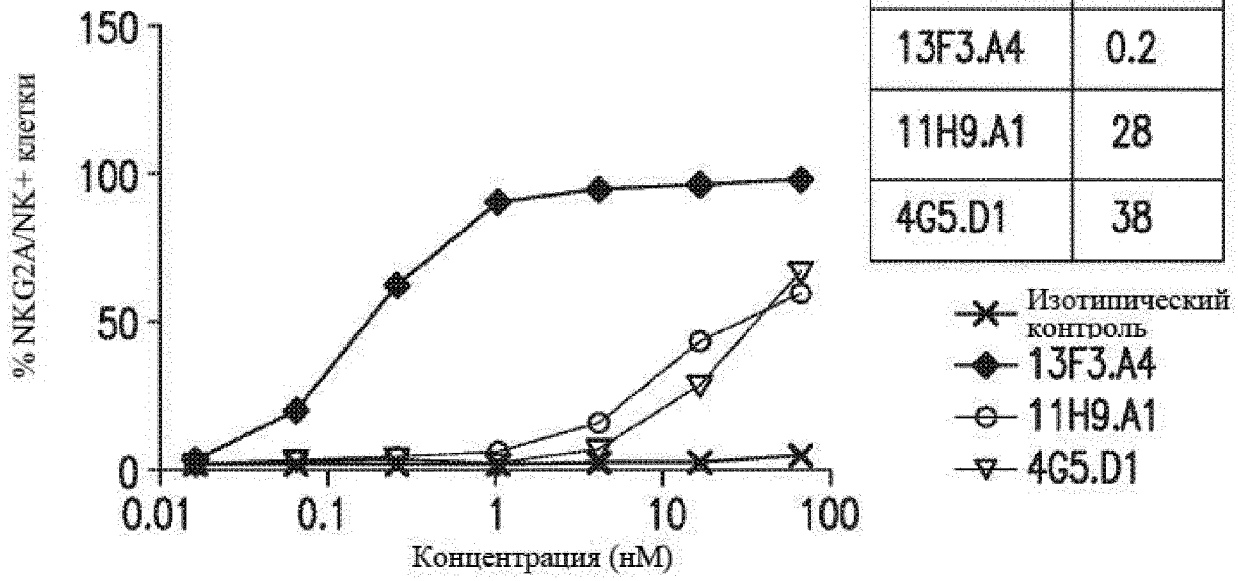


Фиг. 23D

Антитела к NKG2A, связанные с NK-клетками яванского макака



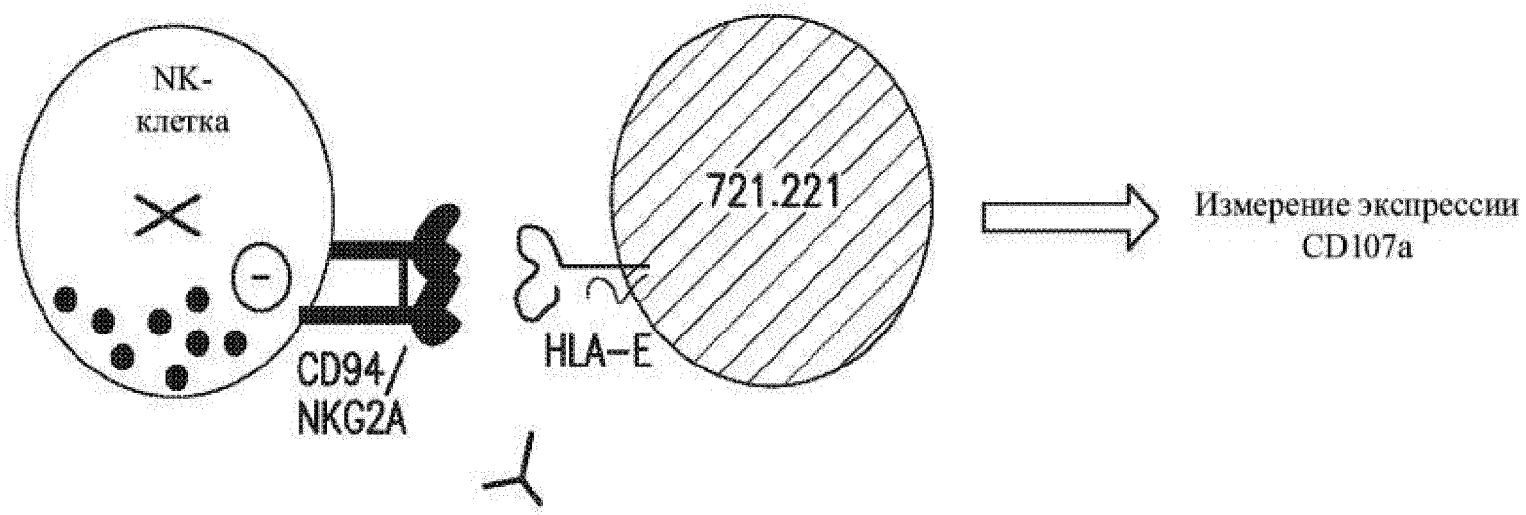
Фиг. 24A



Антитело	EC50 (нМ)
13F3.A4	0.2
11H9.A1	28
4G5.D1	38

Фиг. 24B

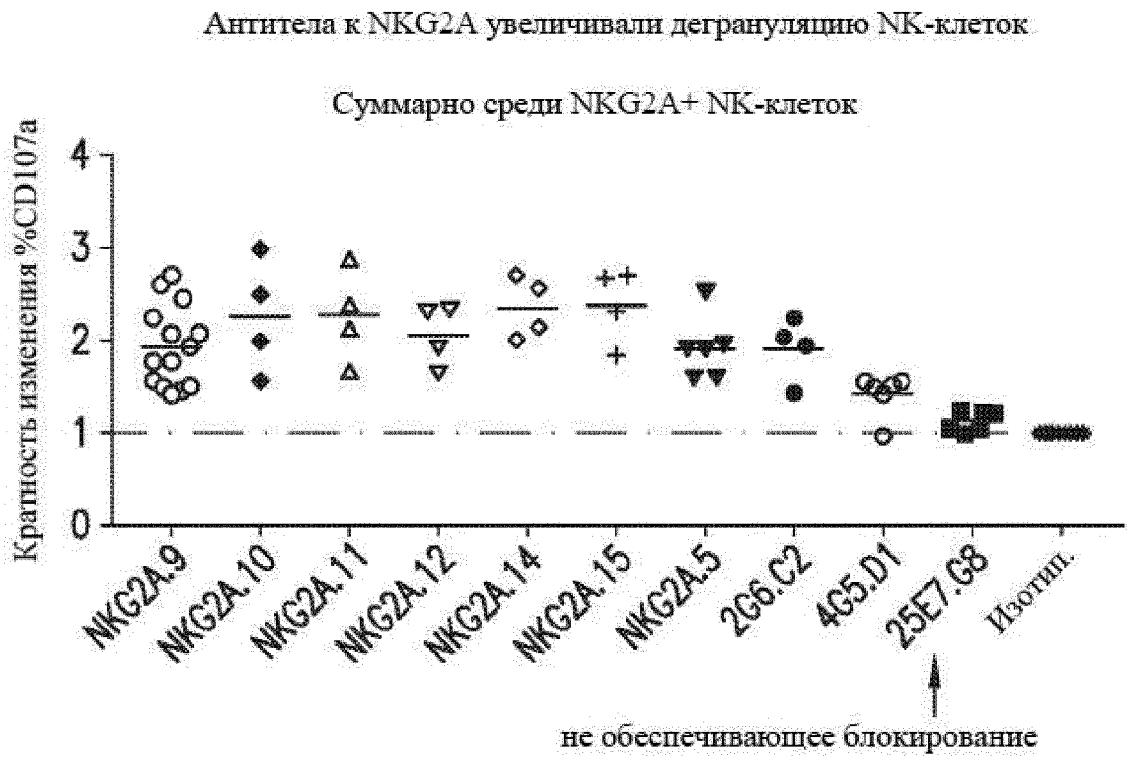
Антитела к NKG2A увеличивали дегрануляцию NK-клеток



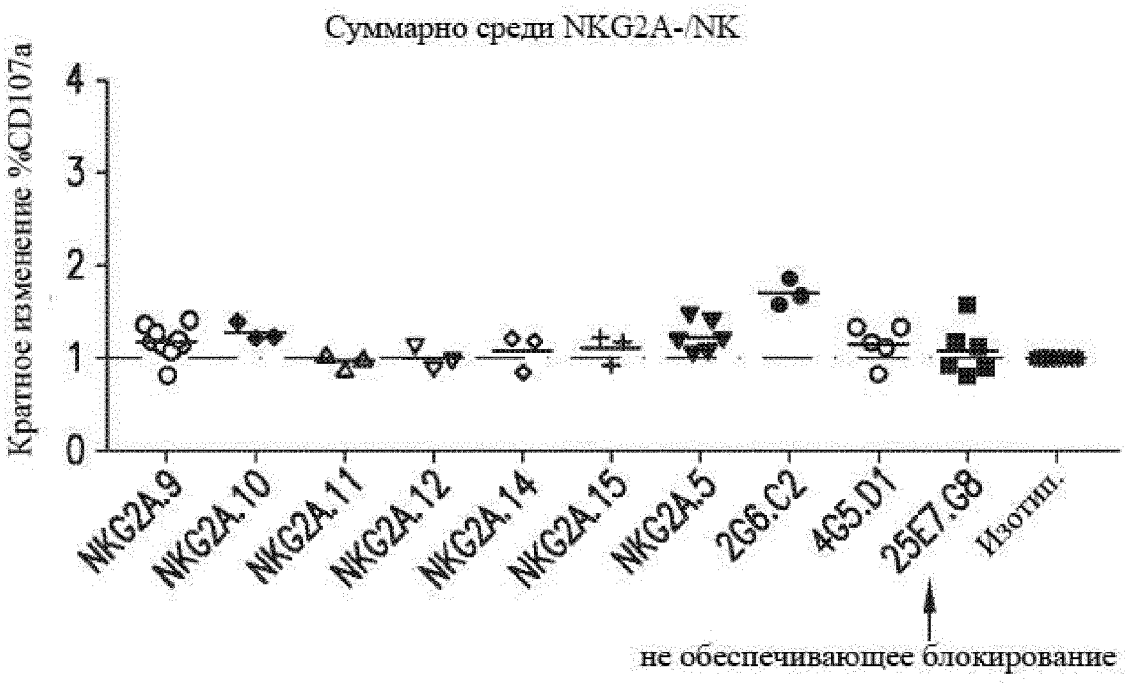
Эффекторы: первичные NK-клетки

Мишени: линия 721.221 целевых В-лимфобластоидных клеток человека, экспрессирующих HLA-E

Фиг. 25А



Фиг. 25B



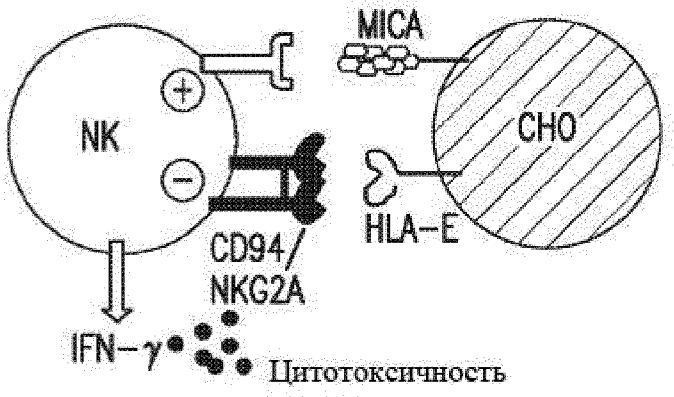
Фиг. 25C

Антитела к NKG2A увеличивали ответы NK-клеток с продуцированием интерферона-гамма (IFNγ)

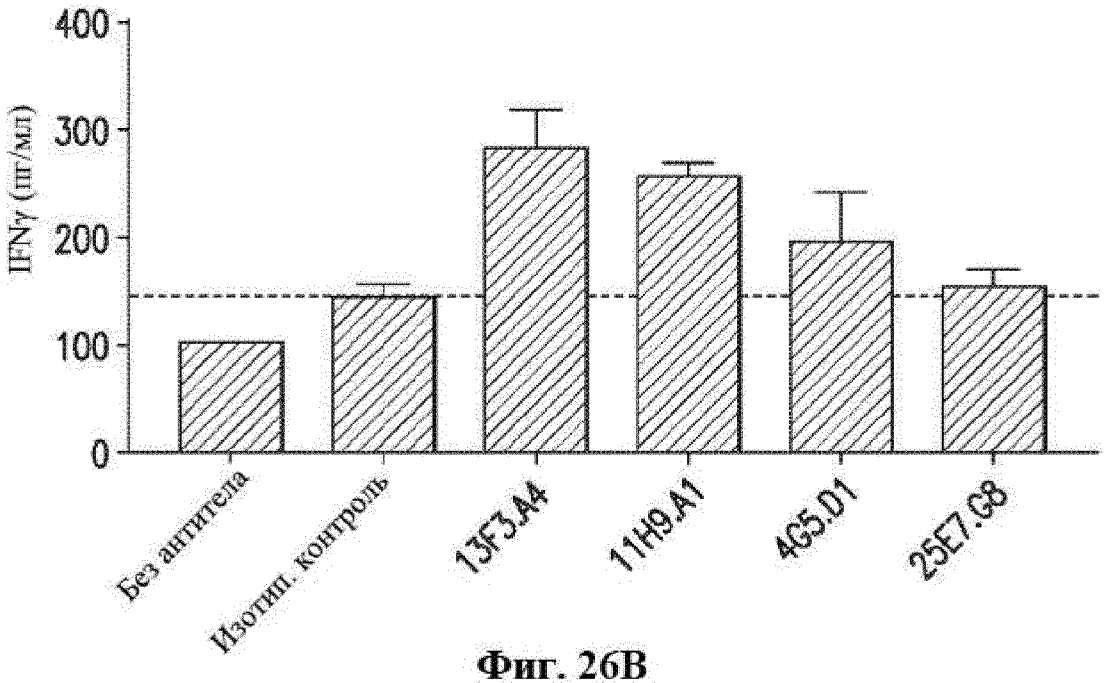
Продуцирование IFNγ

Эффекторы: NKL

Мишени: CHO/MICA/HLA-E

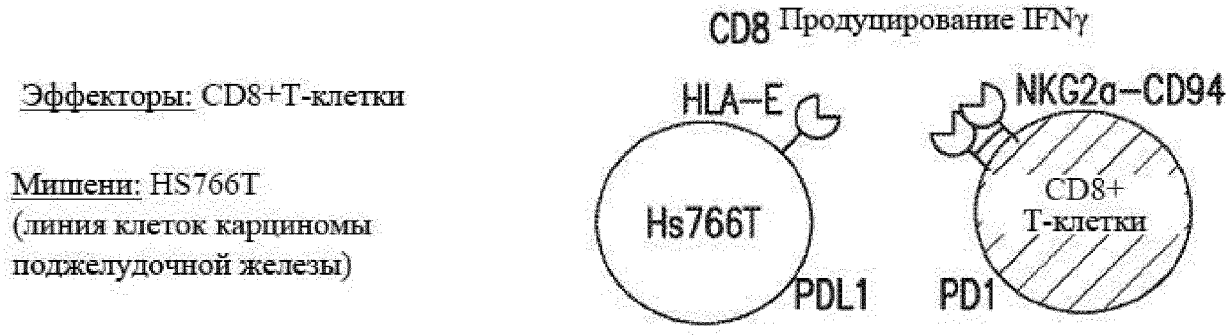


Фиг. 26A



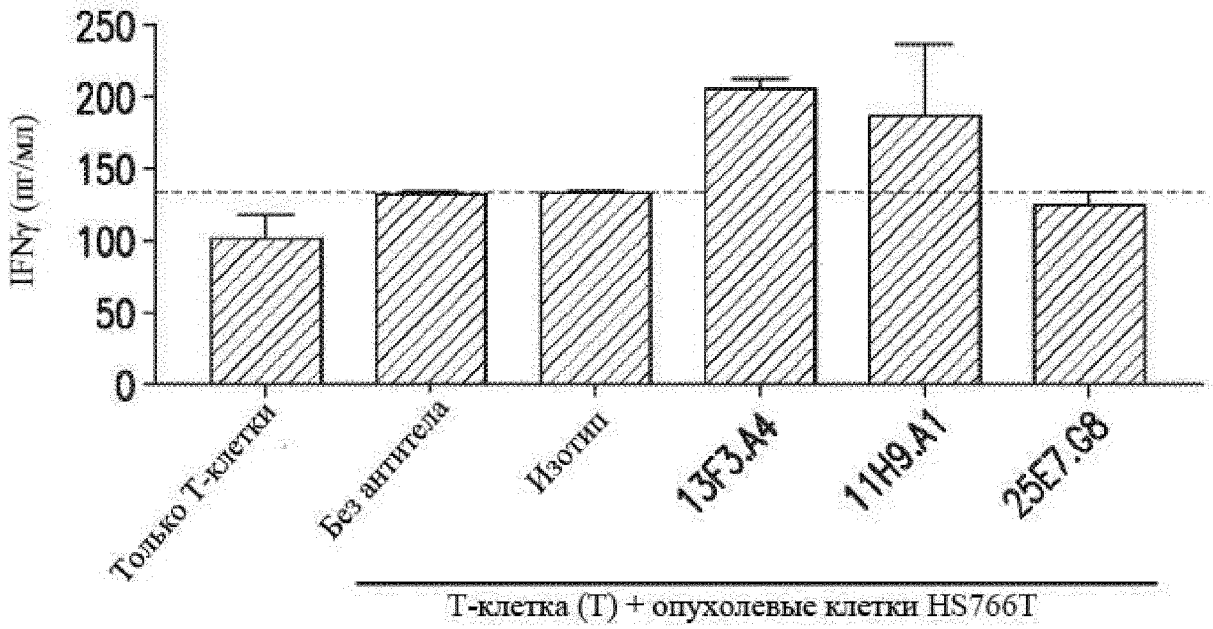
Фиг. 26B

Антитела к NKG2A увеличивали ответы CD8+ Т-клеток с повышенным продуцированием IFNγ



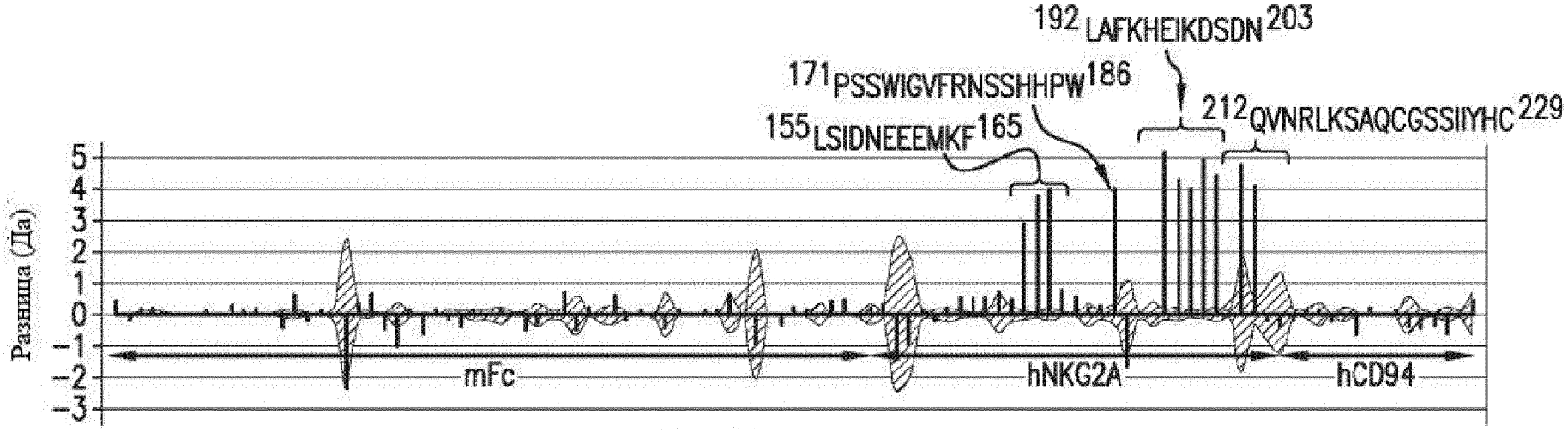
Фиг. 27A

Антитела к NKG2A увеличивали ответы CD8+ Т-клеток с повышенным продуцированием IFNγ



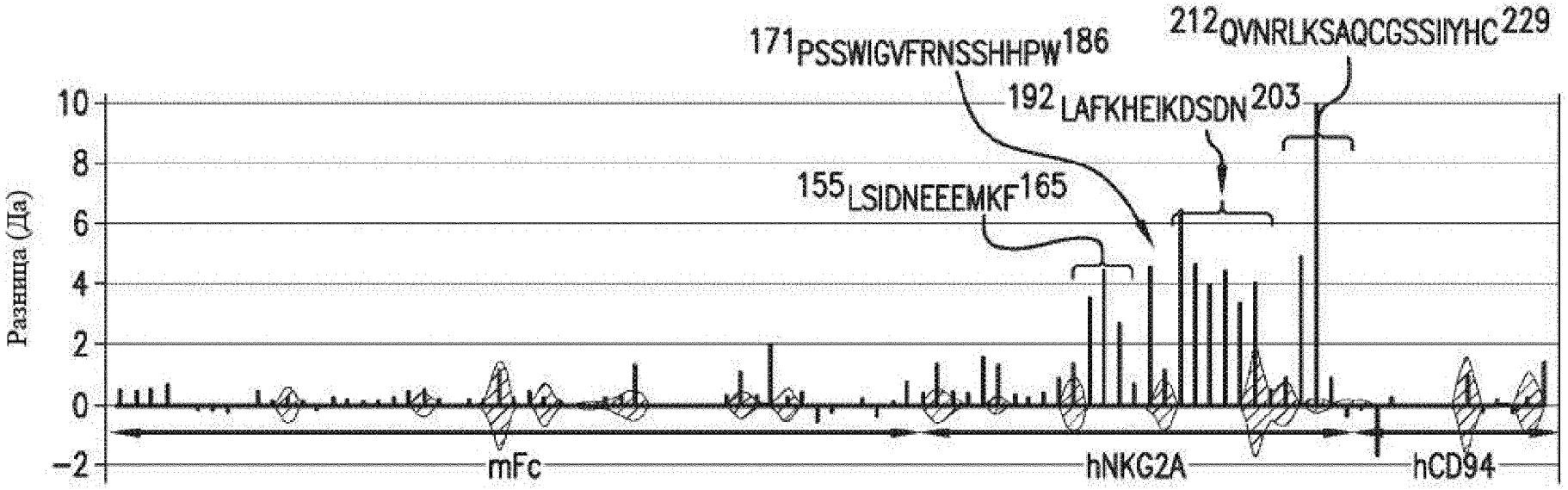
Фиг. 27B

Дифференциальный анализ методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS)
mFc-hNKG2A-hCD94 при взаимодействии с антителом NKG2A.9

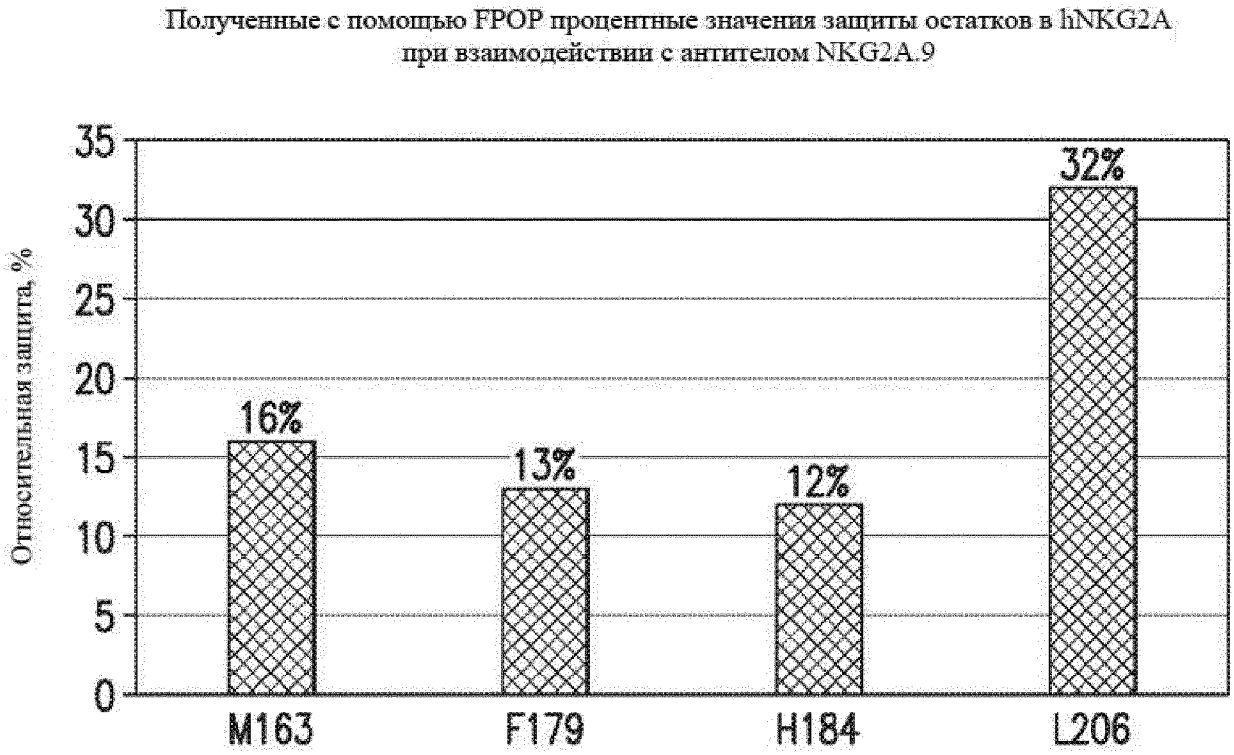


Фиг. 28A

Дифференциальный анализ HDX-MS mFc-NKG2A-CD94 при взаимодействии с антителом 13F3.A4

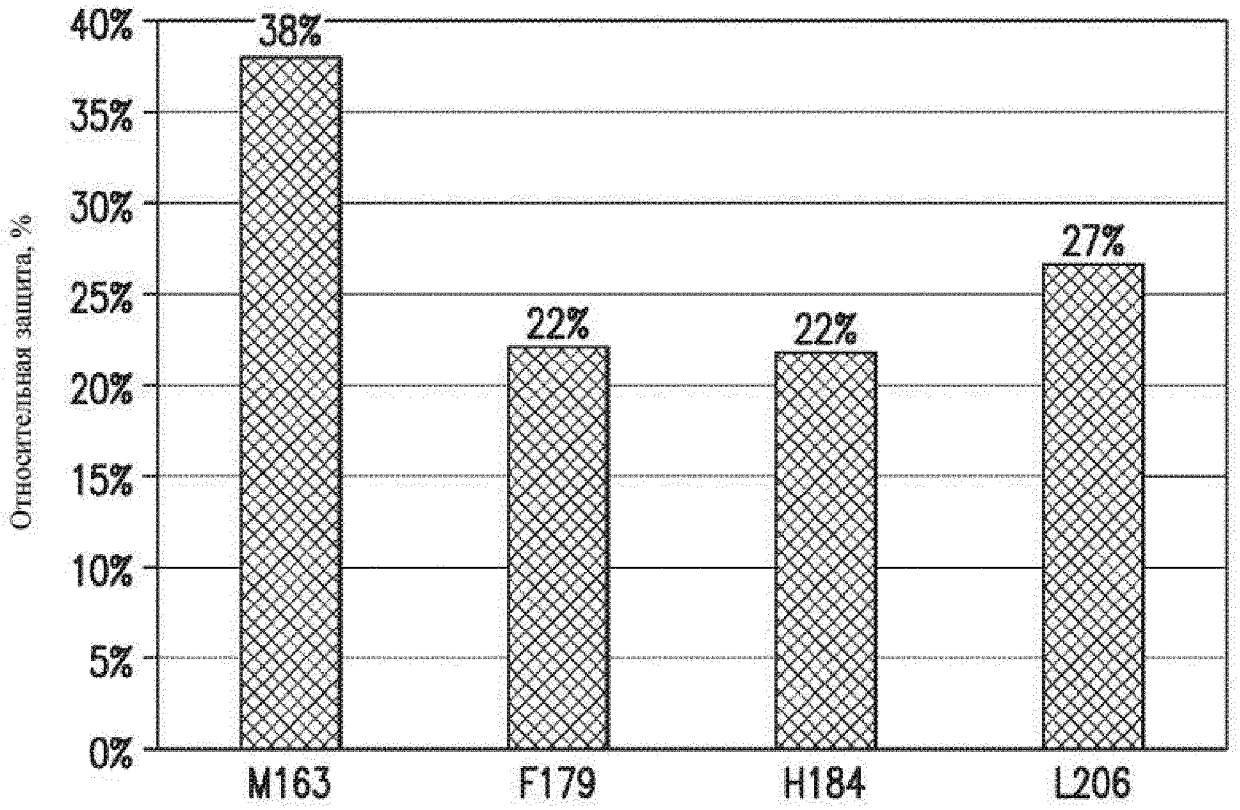


Фиг. 28B

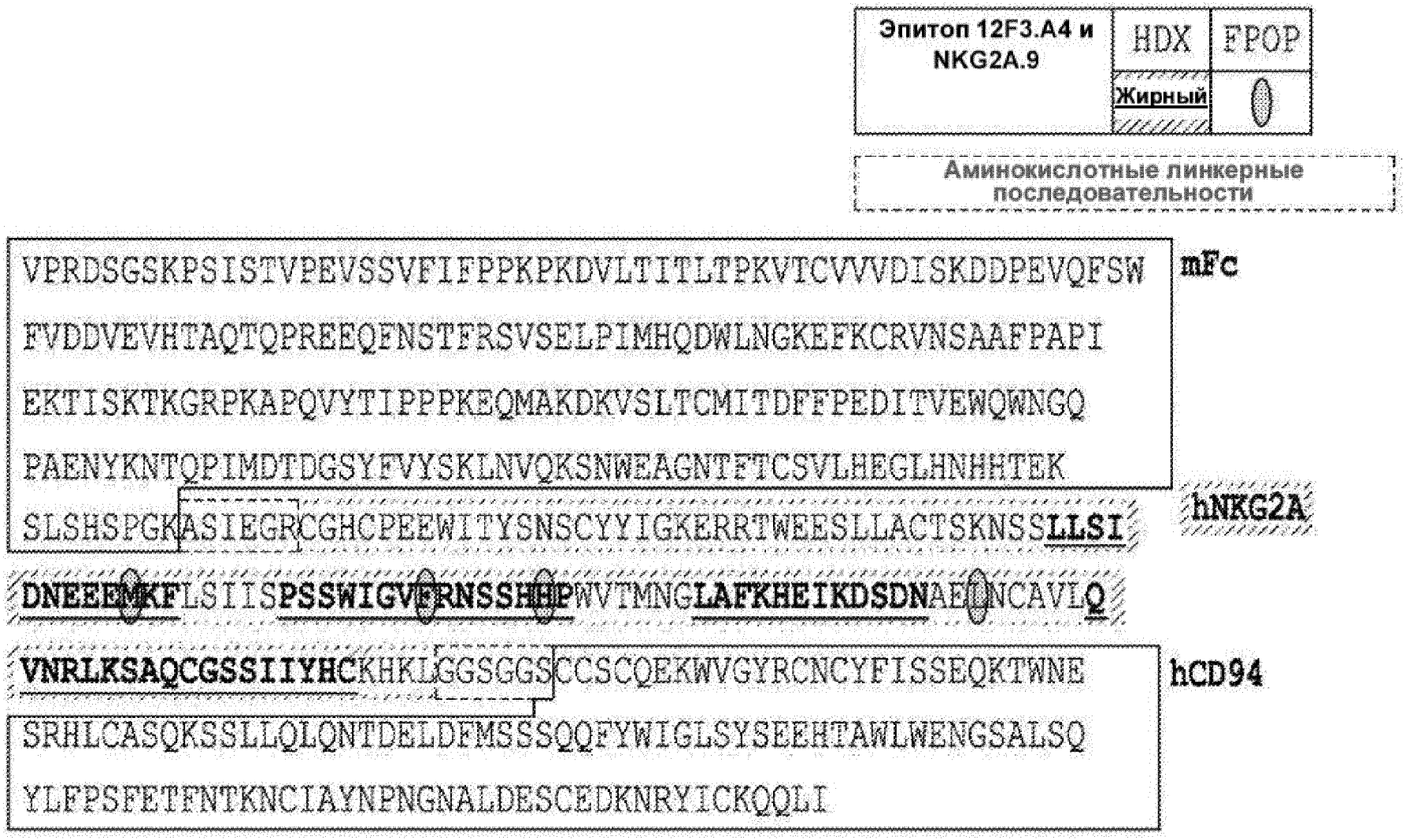

Полученные с помощью FPOP процентные значения защиты остатков в hNKG2A при взаимодействии с антителом NKG2A.9
Относительная защита, %
35
30
25
20
15
10
5
0
16%
13%
12%
32%
M163
F179
H184
L206

Фиг. 29A

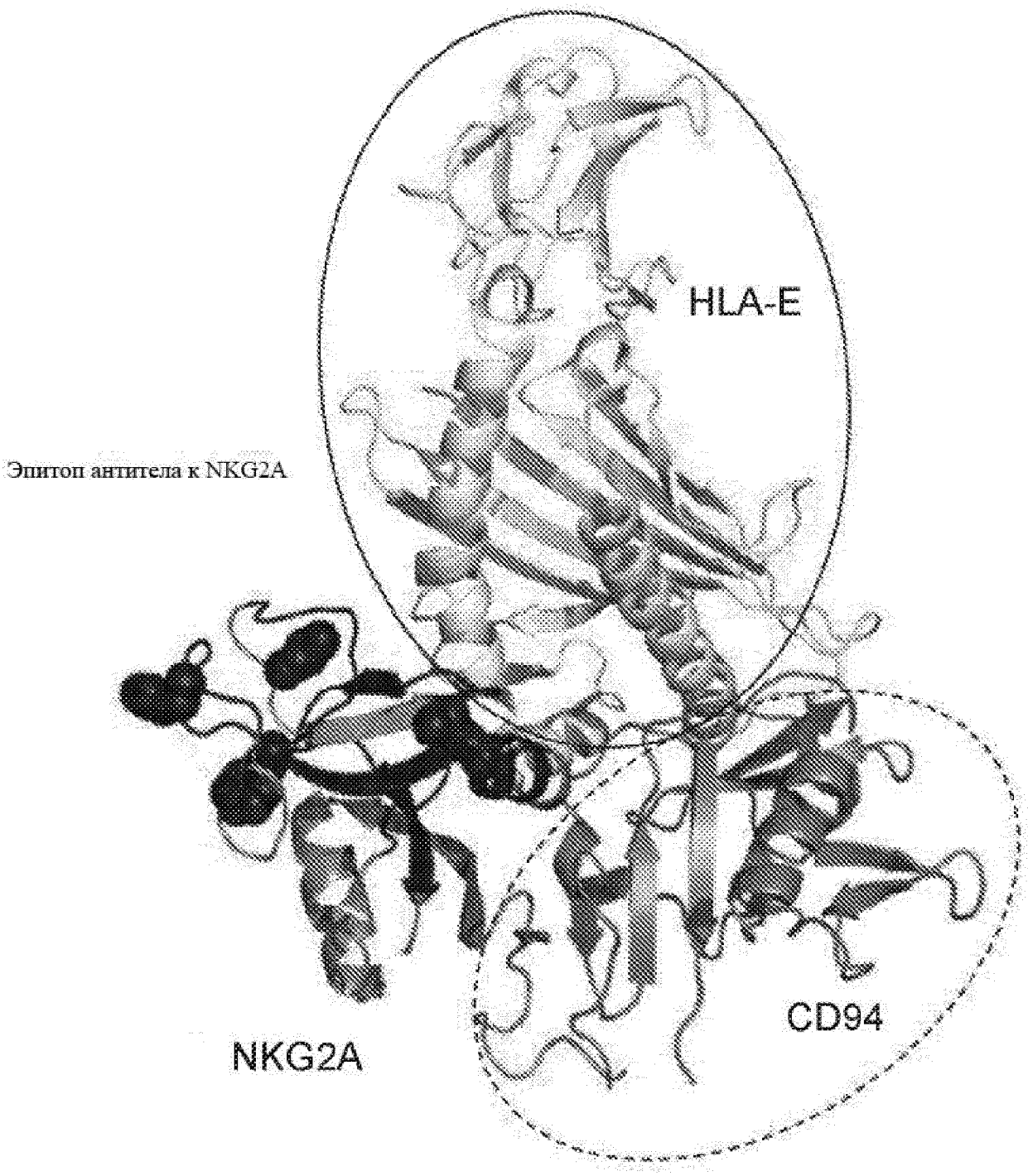
Полученные с помощью FPOP процентные значения защиты остатков в hNKG2A при взаимодействии с антителом 13F3.A4



Фиг. 29B


Эпитоп 12F3.A4 и NKG2A.9
HDX
FPOP
Жирный
Аминокислотные линкерные последовательности
VPRDSGSKPSISTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSW
FVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPI
EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ
PAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEK
SLSHSPGKASIEGRCGHCPEEWITYSNSCYYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSI
DNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQ
VNRLKSAQCGSSIIYHCKHKLGGSGGSCCSCQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNE
SRHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSALSQ
YLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI
mFc
hNKG2A
hCD94

Фиг. 30



Фиг. 31

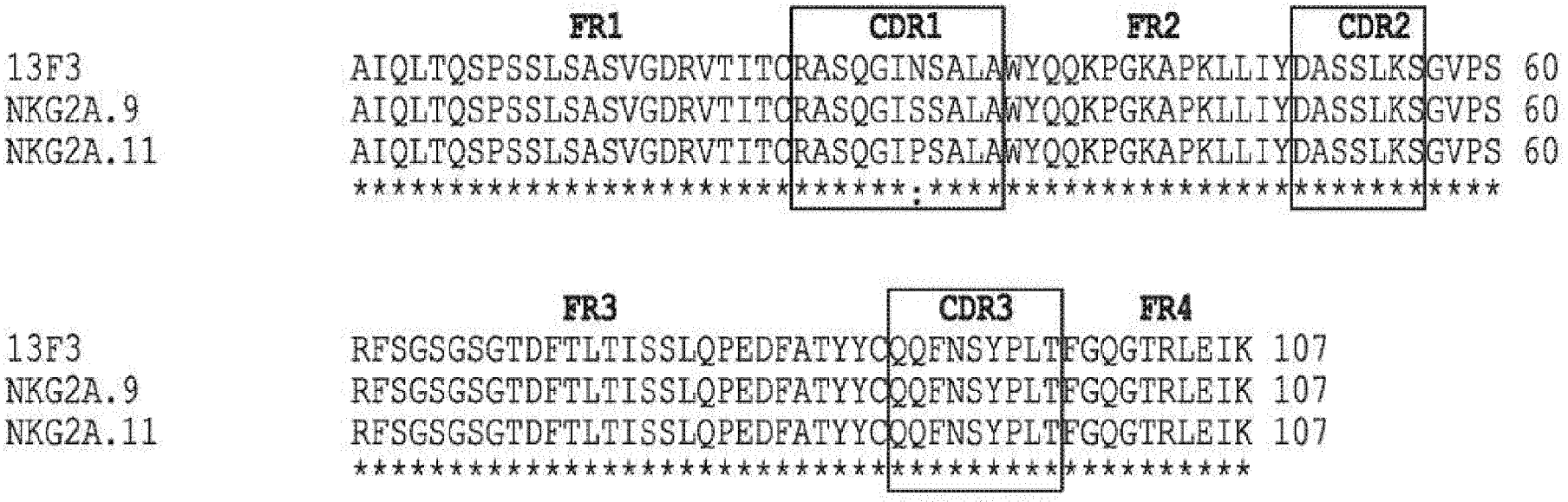
Выравнивание с помощью Clustal 2.1 вариабельных участков тяжелой цепи антител к NKG2A

```
                          FR1                                CDR1  FR2                CDR2
13F3          EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYADSVKG 66
NKG2a.9       EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYADSVKG 66
NKG2a.11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYADSVKG 66
              ************************************************************** 

                                FR3                          CDR3      FR4
13F3          RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWGLPFDYWGQGILVTVSS 118
NKG2a.9       RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWGLPFDYWGQGTLVTVSS 118
NKG2a.11      RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWGLPFDYWGQGTLVTVSS 118
              ************************************************** ******
```

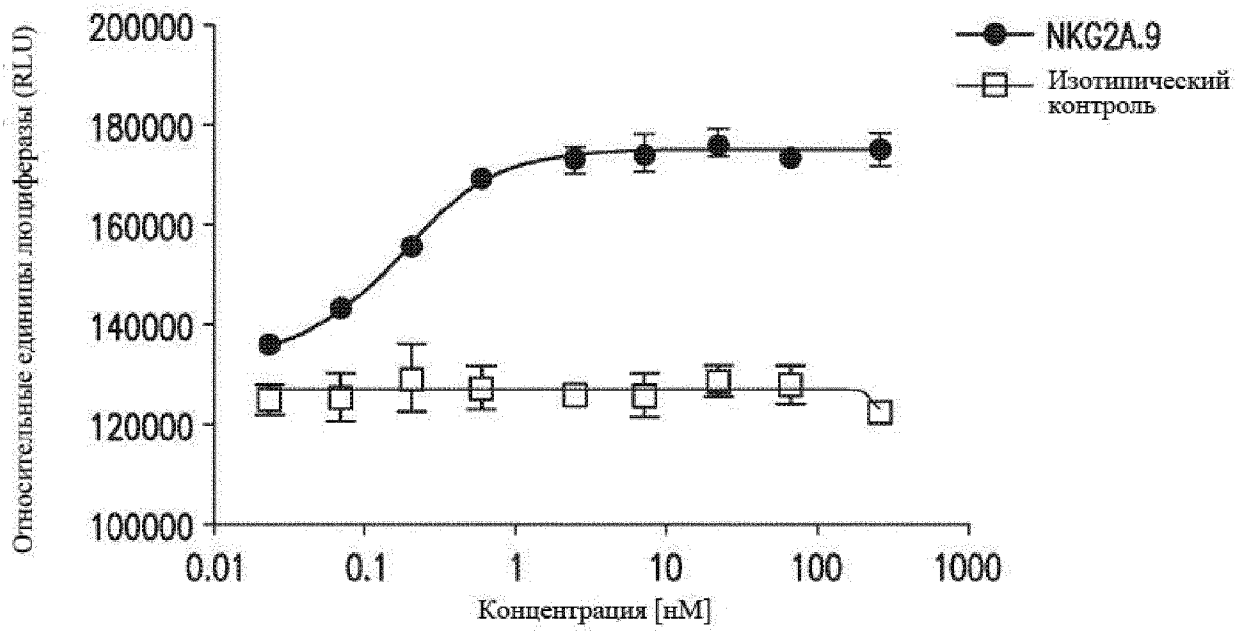
Фиг. 32A

Выравнивание с помощью Clustal 2.1 вариабельных участков легкой цепи антител к NKG2A



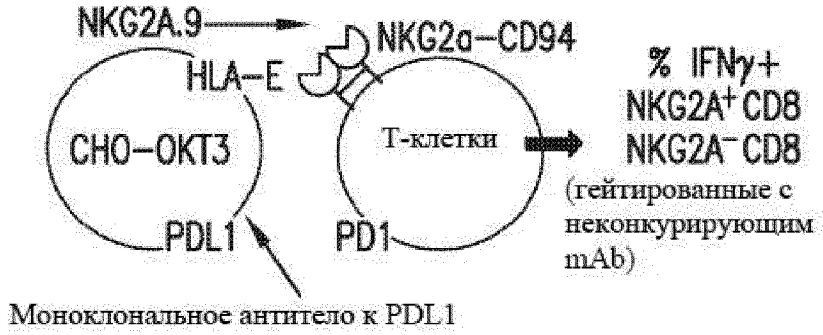
Фиг. 32B

NKG2A.9 обращало ингибирование передачи сигнала NK-kB в NKG2A-экспрессирующих клетках Jurkat, простимулированных посредством CHO/scOKT3/HLA-E



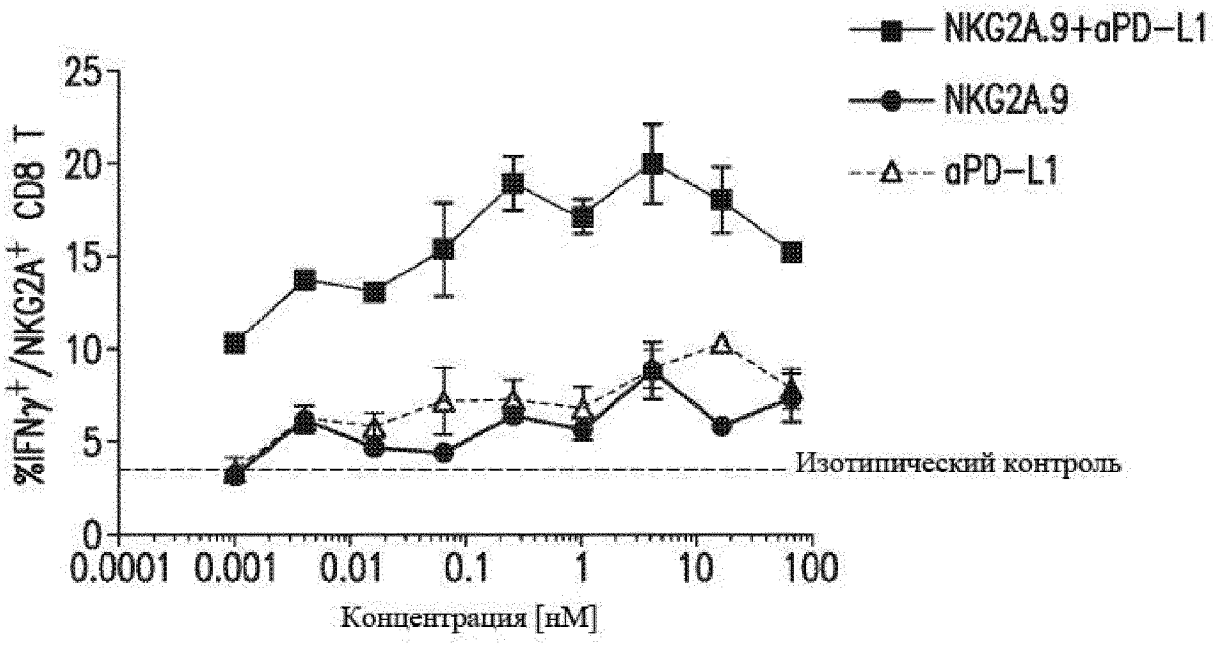
Фиг. 33

Антитела NKG2A.9 и антитела к PD-L1 увеличивали индукцию INFγ NKG2A+ CD8 T-клетками, совместно культивируемых с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1



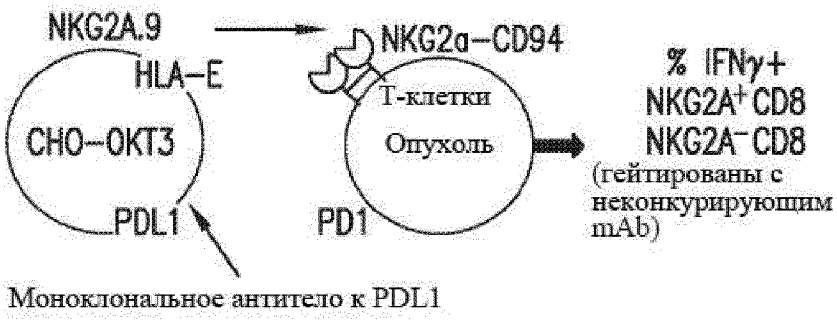
Фиг. 34A

Антитела NKG2A.9 и антитела к PD-L1 увеличивали индукцию INFγ NKG2A+ CD8 T-клетками, совместно культивируемых с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1

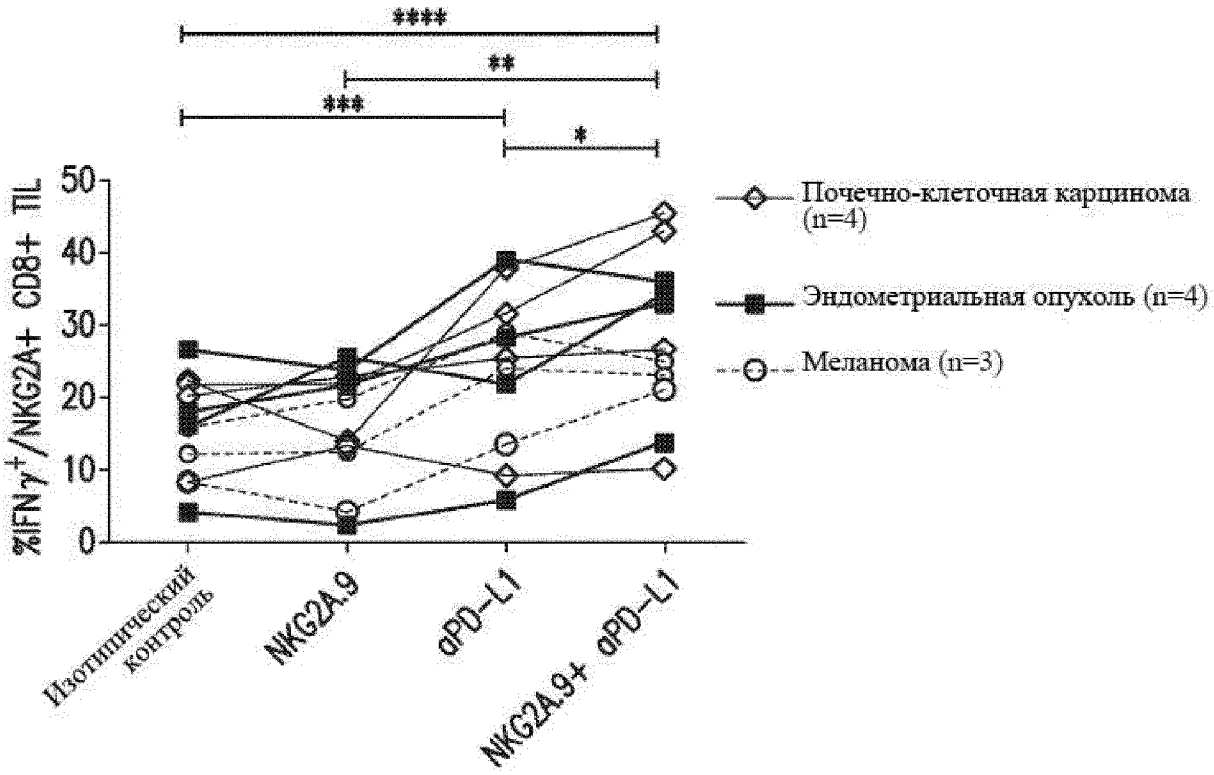


Фиг. 34B

Антитела NKG2A.9 и антитела к PD-L1 увеличивали продуцирование INFγ противоопухолевыми эффекторными NKG2A+ CD8 Т-клетками, совместно культивированными с CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1



Фиг. 35A

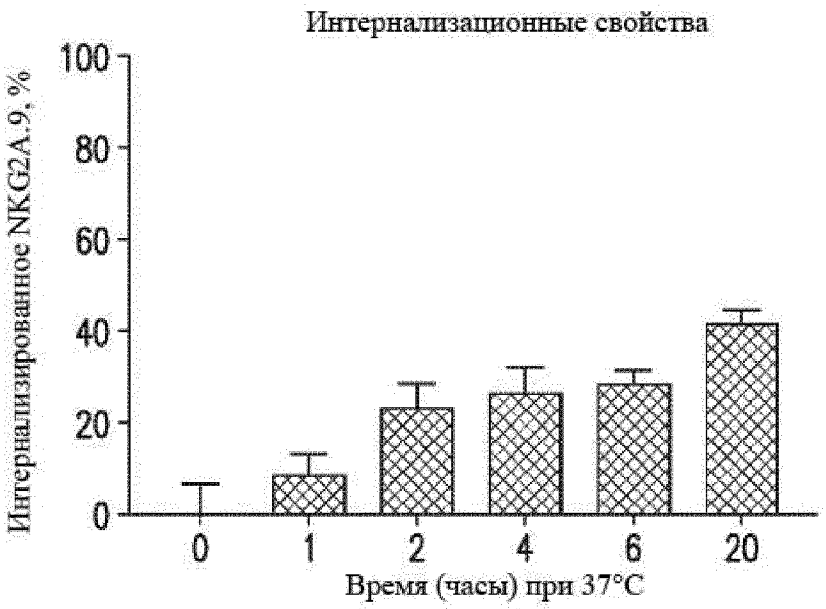


Парный t-критерий ****p<0,0001, ***p<0,0005, **p<0,005, *p<0,05

⊢⊣ Представляет собой сравнение групп

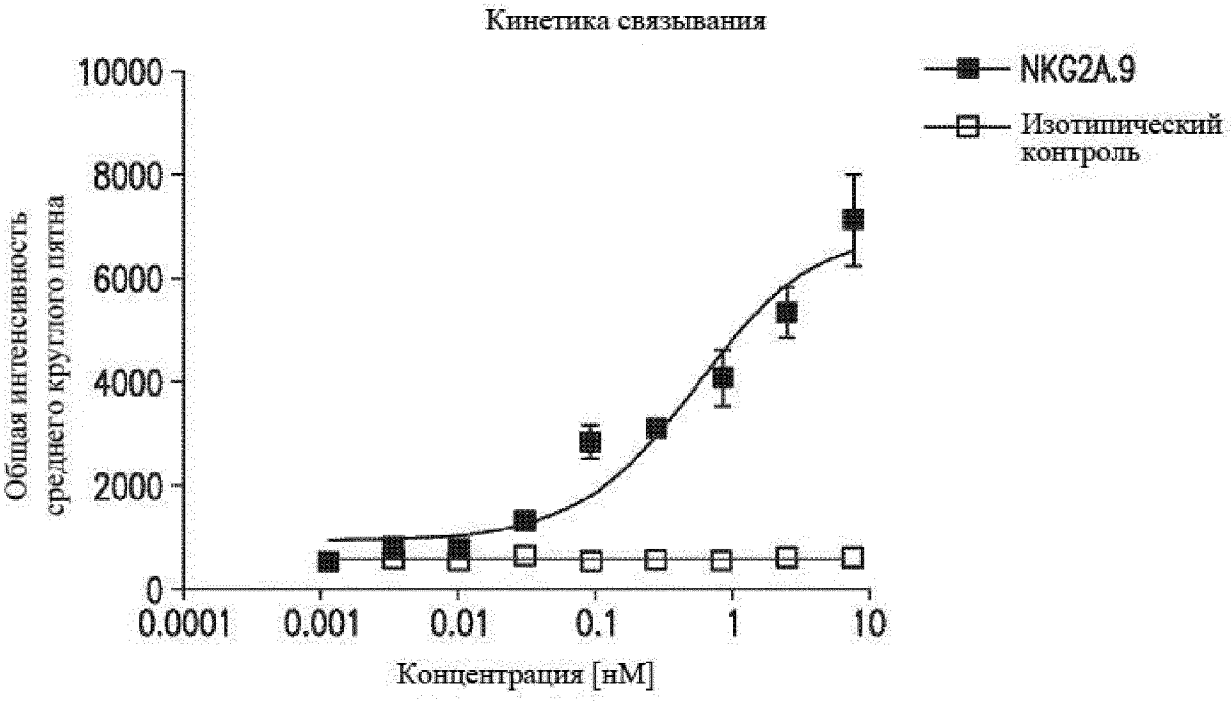
Фиг. 35B

Антитело NKG2A.9 интернализировалось после связывания с NKG2A-экспрессирующими клетками



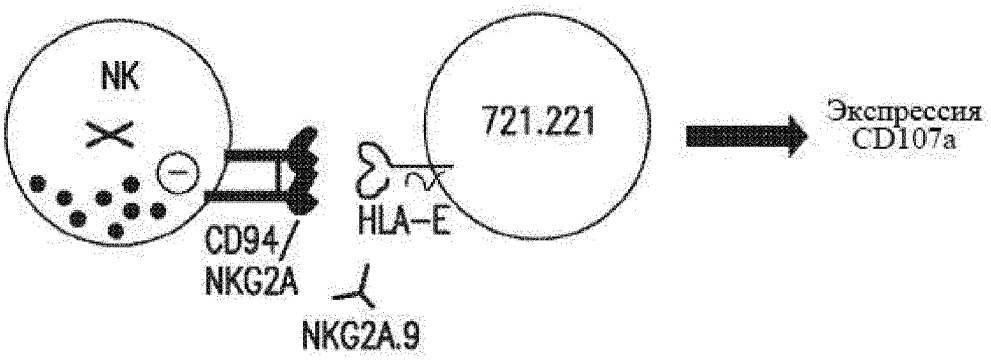
Фиг. 36A

Антитело NKG2A.9 интернализировалось после связывания с NKG2A-экспрессирующими клетками



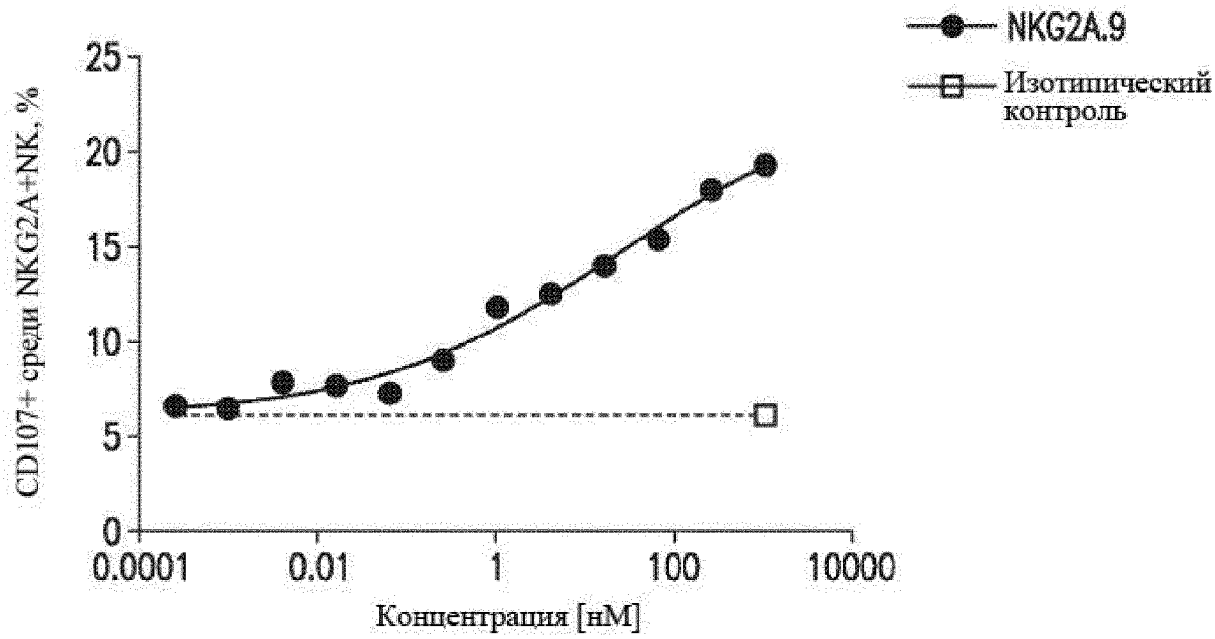
Фиг. 36B

Антитело NKG2A.9 увеличивало дегрануляцию NK-клеток и лизис HLA-E-экспрессирующих клеток опухоли головы и шеи



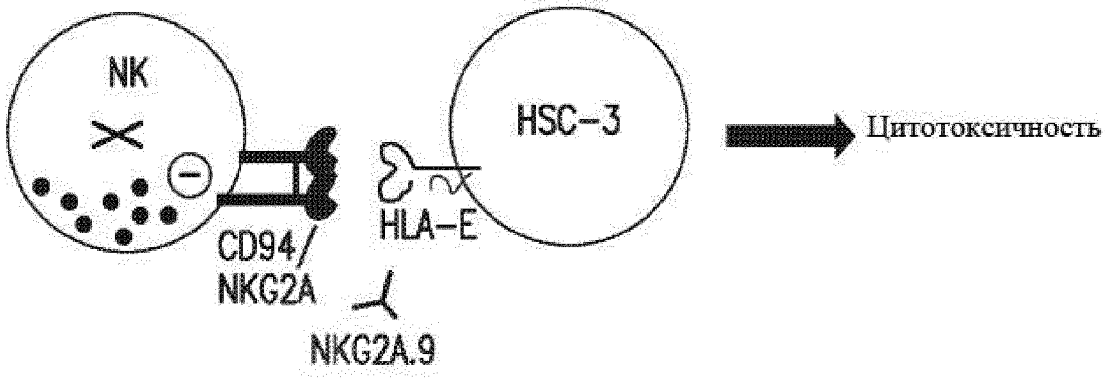
Фиг. 37A

Антитело NKG2A.9 увеличивало дегрануляцию NK-клеток и лизис HLA-E-экспрессирующих клеток опухоли головы и шеи



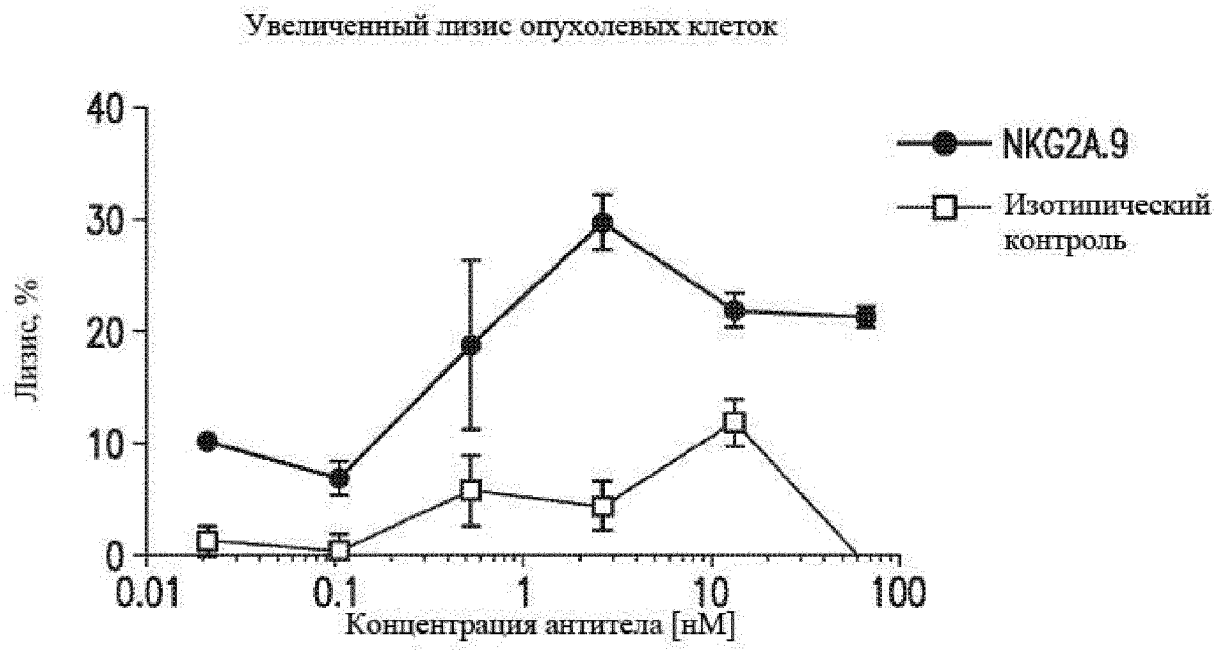
Фиг. 37B

Антитело NKG2A.9 увеличивало дегрануляцию NK-клеток и лизис HLA-E-экспрессирующих клеток опухоли головы и шеи



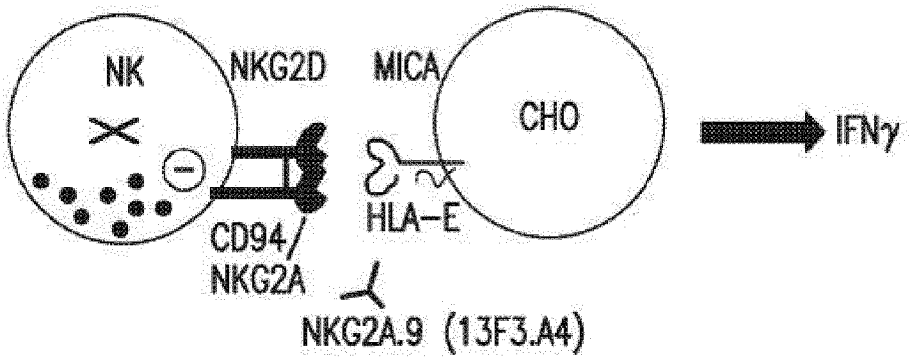
Фиг. 37C

Антитело NKG2A.9 увеличивало дегрануляцию NK-клеток и лизис HLA-E-экспрессирующих клеток опухоли головы и шеи



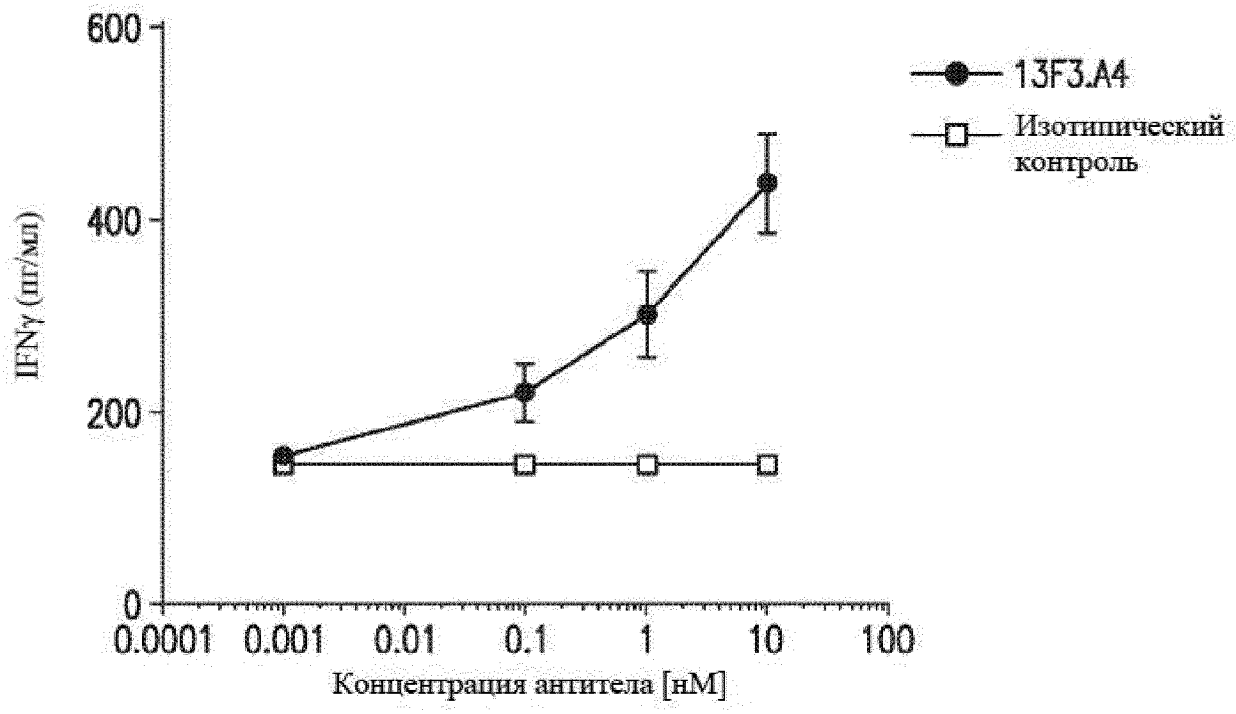
Фиг. 37D

Антитело 13F3.A4 увеличивало функциональную активность клеток-натуральных киллеров



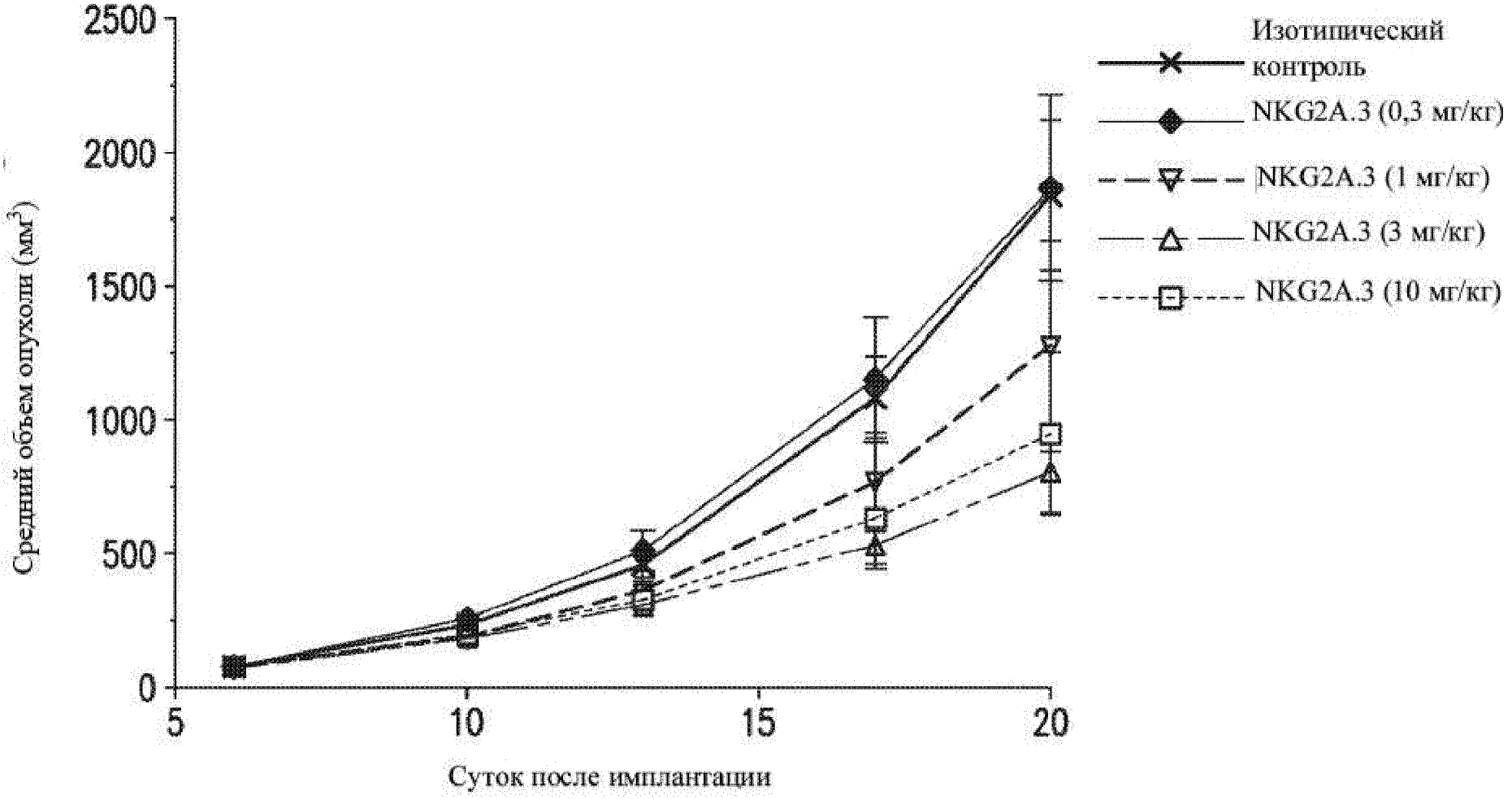
Фиг. 38A

Антитело 13F3.A4 увеличивало функциональную активность клеток -атуральных киллеров

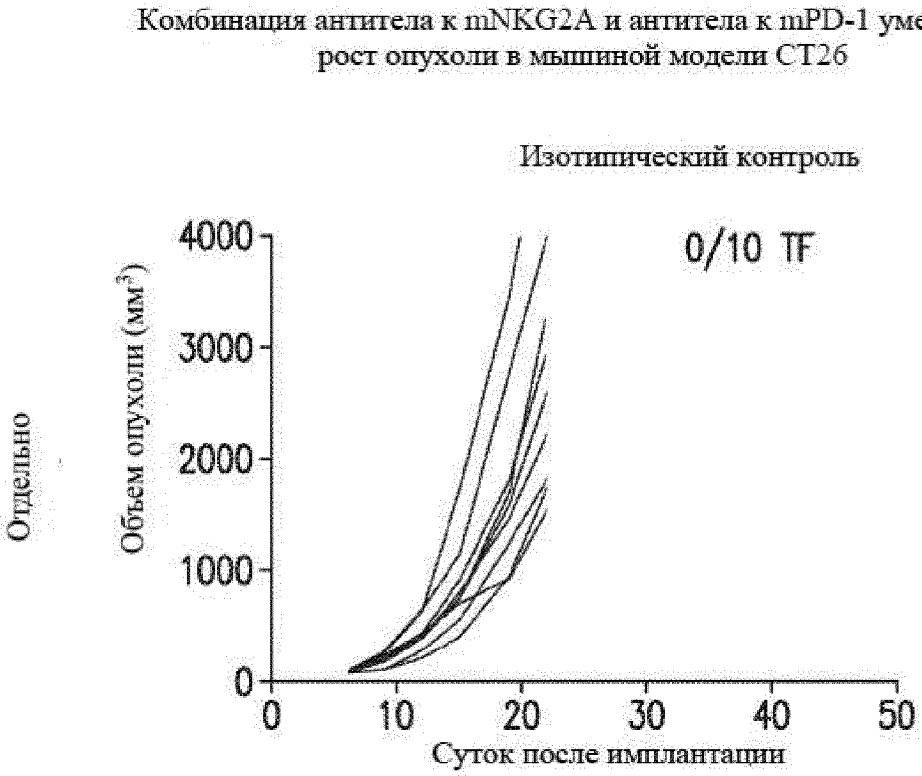


Фиг. 38B

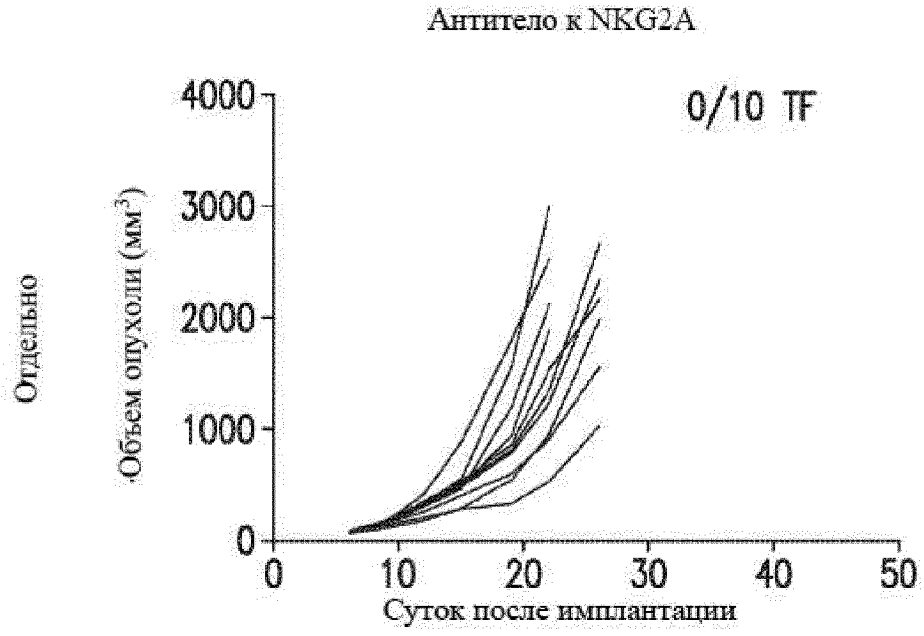
Монотерапия антителом к mNKG2A ингибировала рост опухоли в модели опухоли карциномы толстой кишки CT26



Фиг. 39

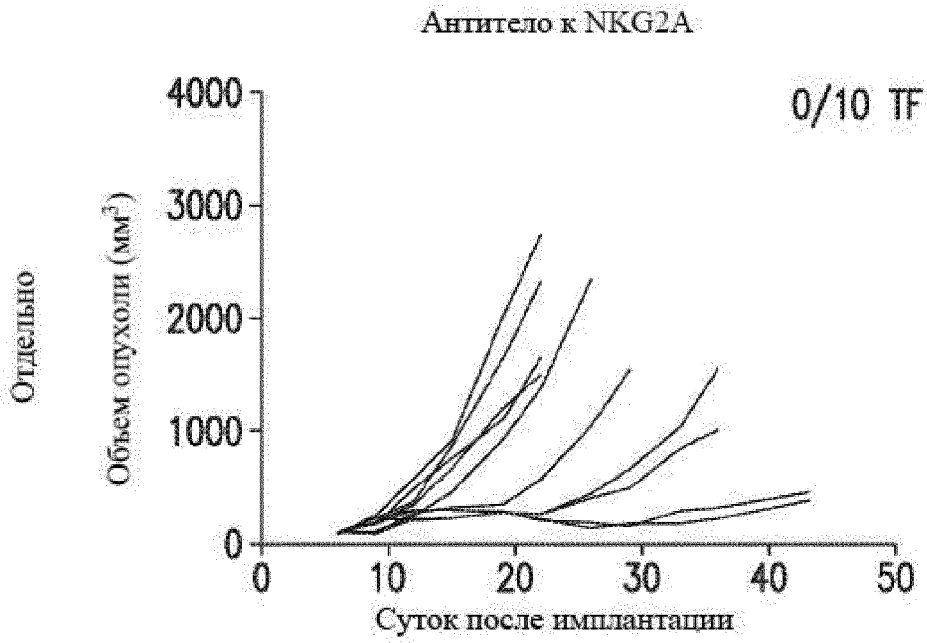


Фиг. 40A

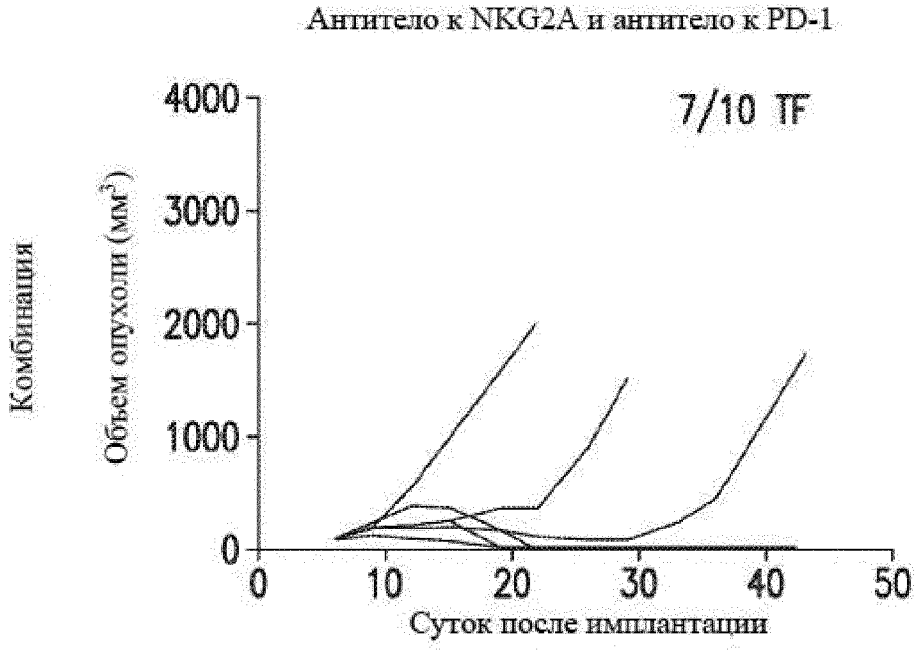


Фиг. 40B

Комбинация антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1 уменьшала рост опухоли в мышиной модели CT26

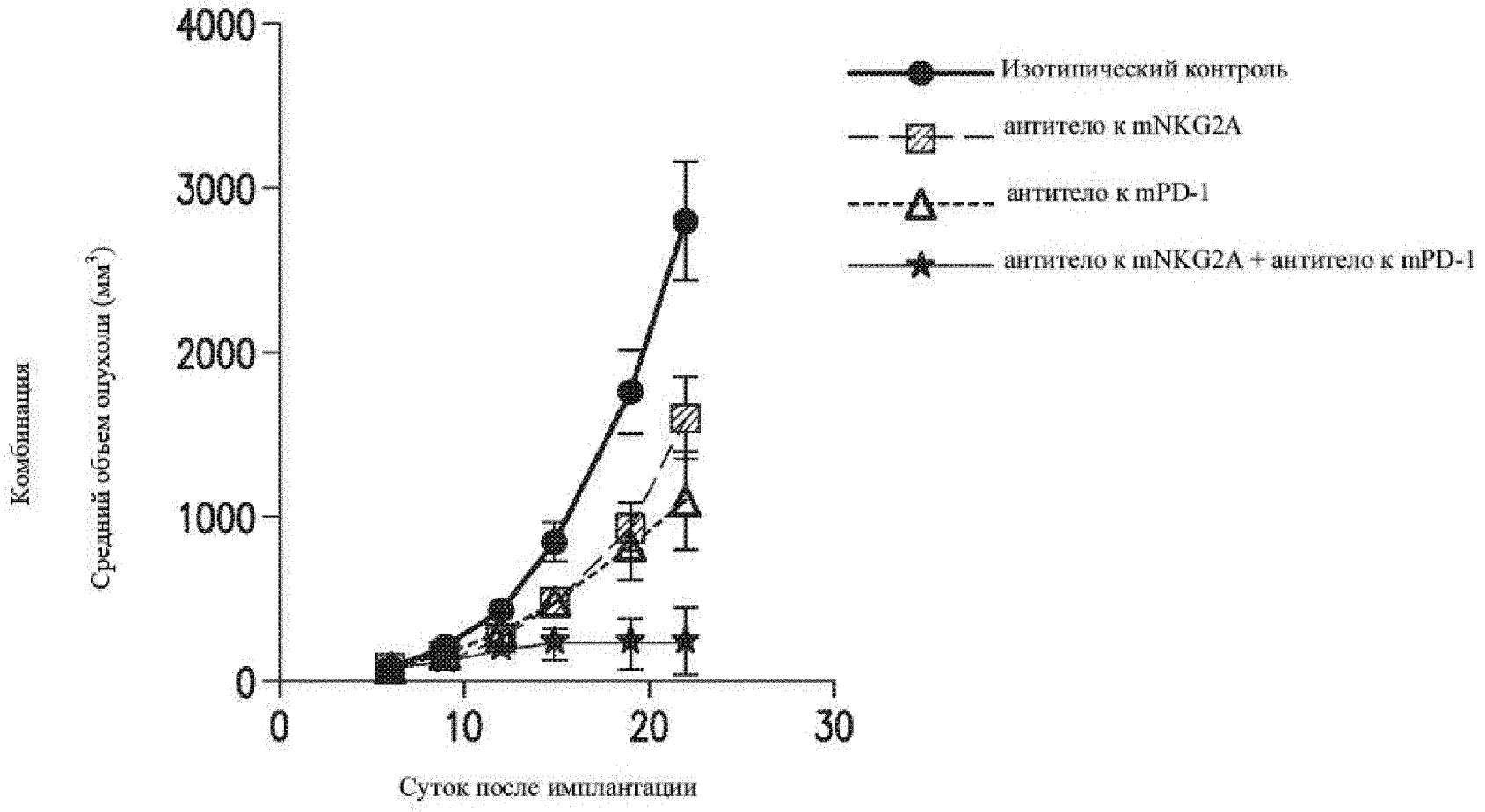


Фиг. 40C



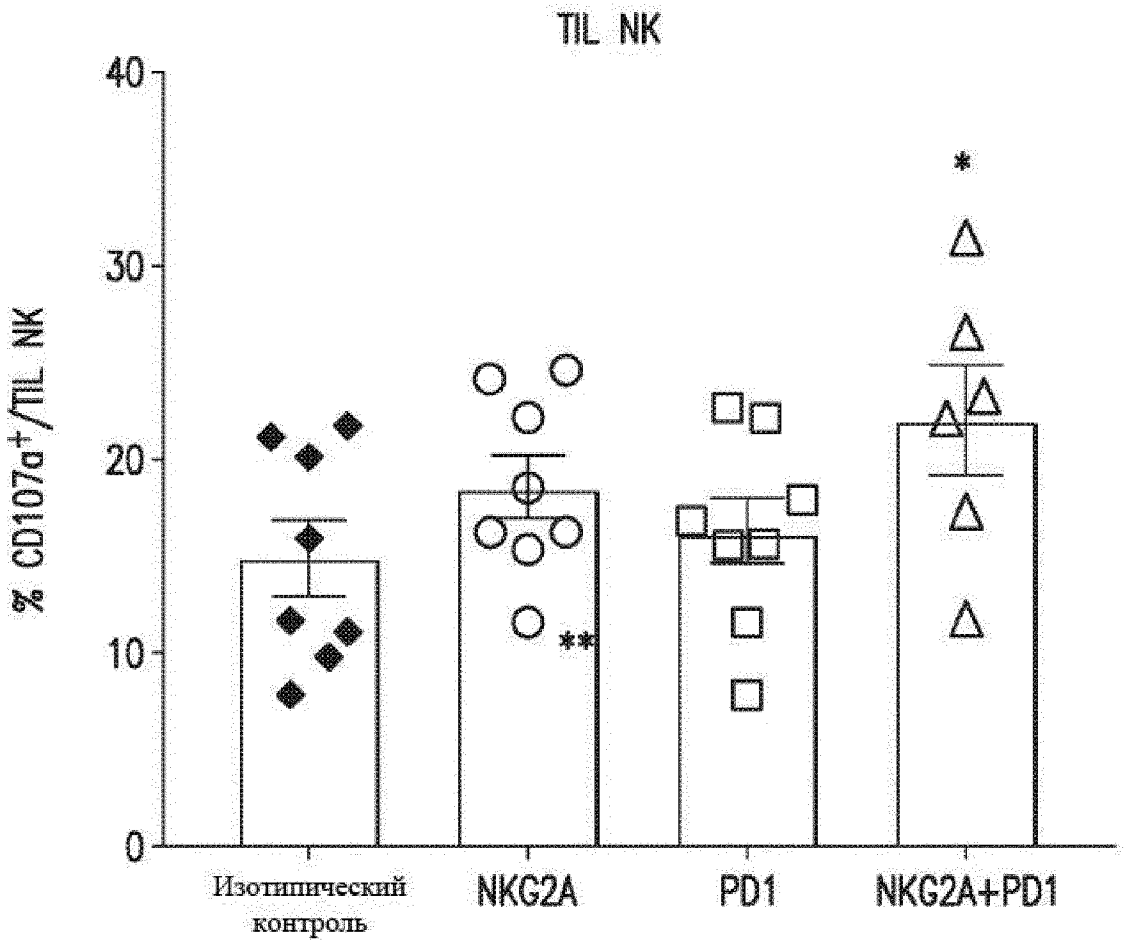
Фиг. 40D

Комбинация антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1 уменьшала рост опухоли в мышиной модели CT26



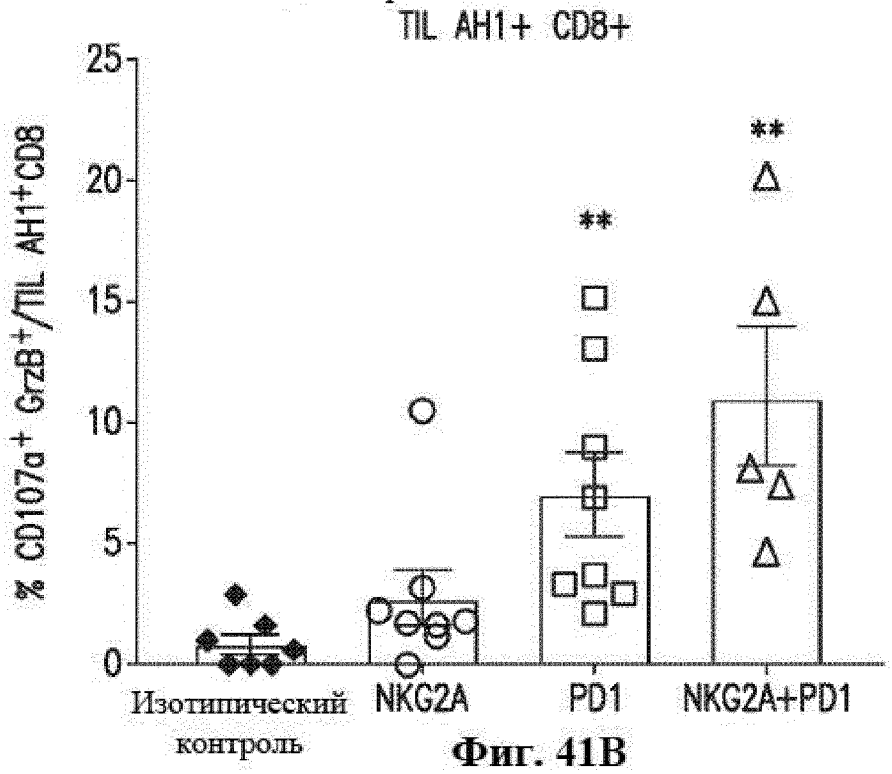
Фиг. 40E

Антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1 увеличивали цитотоксичность NK-клеток и опухолеспецифических CD8 Т-клеток и уровень INFγ в мышиной модели карциномы толстой кишки CT26



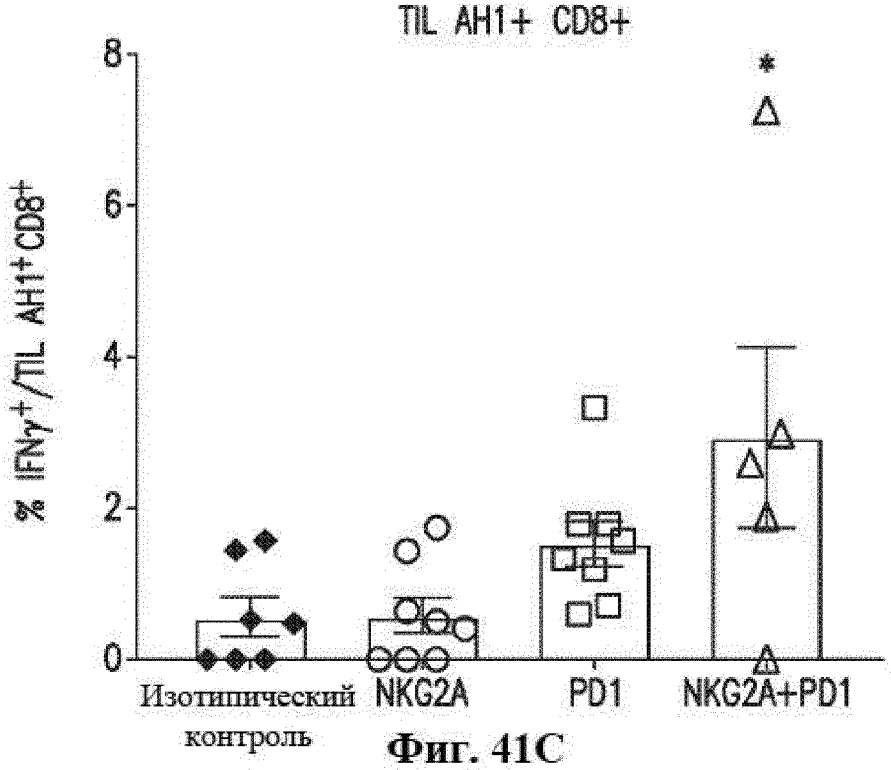
Фиг. 41A

Антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1 увеличивали цитотоксичность NK-клеток и опухолеспецифических CD8 Т-клеток и уровень INFγ в мышиной модели карциномы толстой кишки CT26



Фиг. 41B

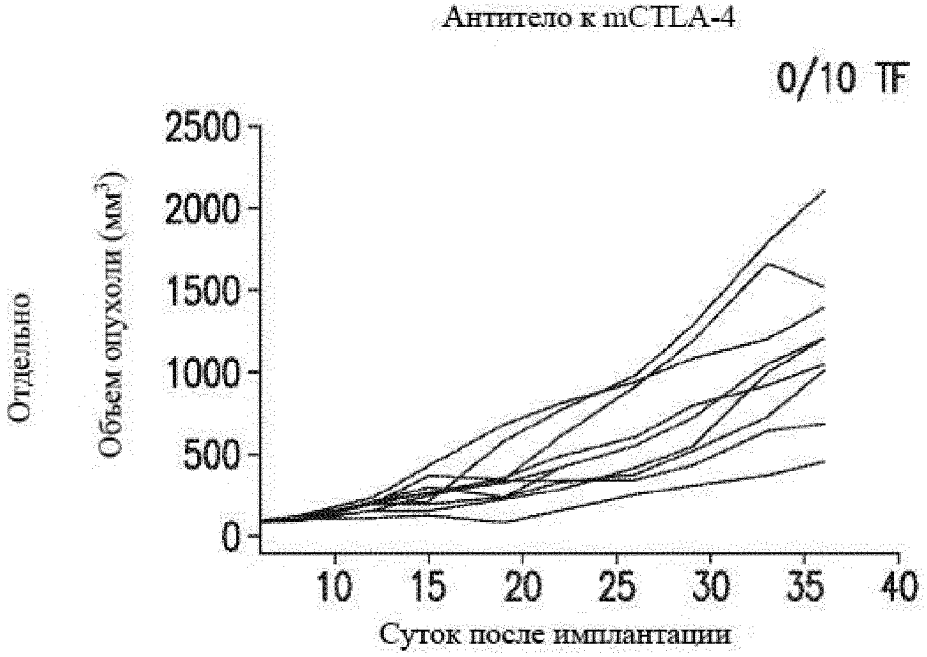
Антитела к mNKG2A и антитела к mPD-1 увеличивали цитотоксичность NK-клеток и опухолеспецифических CD8 Т-клеток и уровень INFγ в мышиной модели карциномы толстой кишки CT26



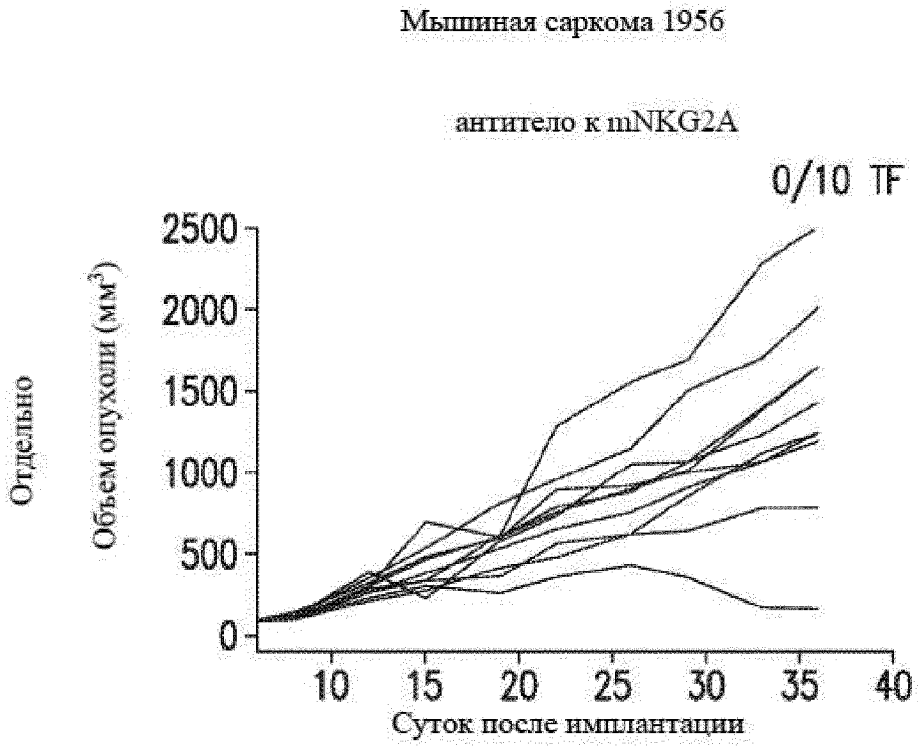
Фиг. 41C



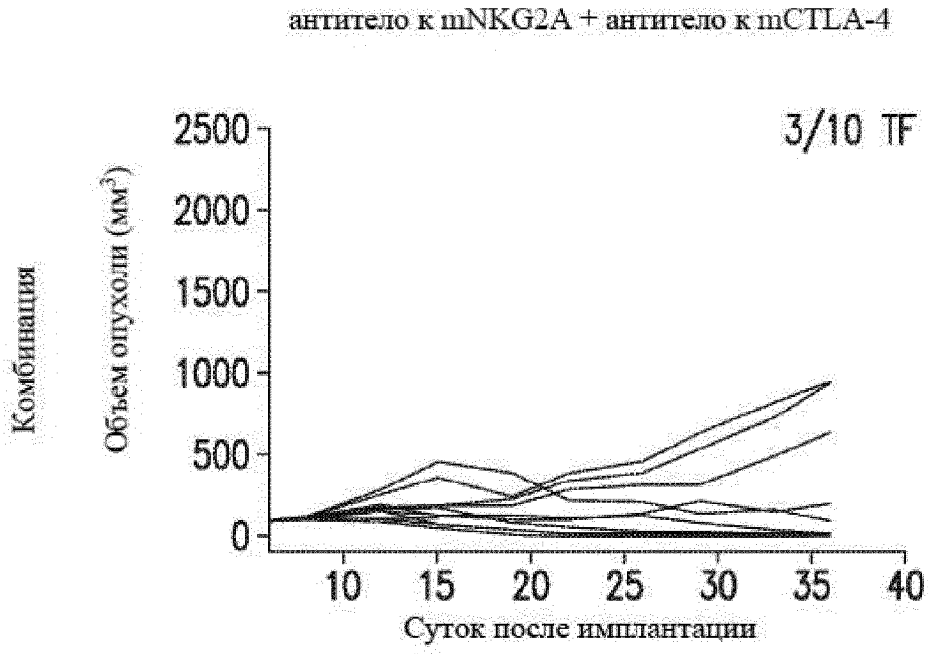
Фиг. 42A



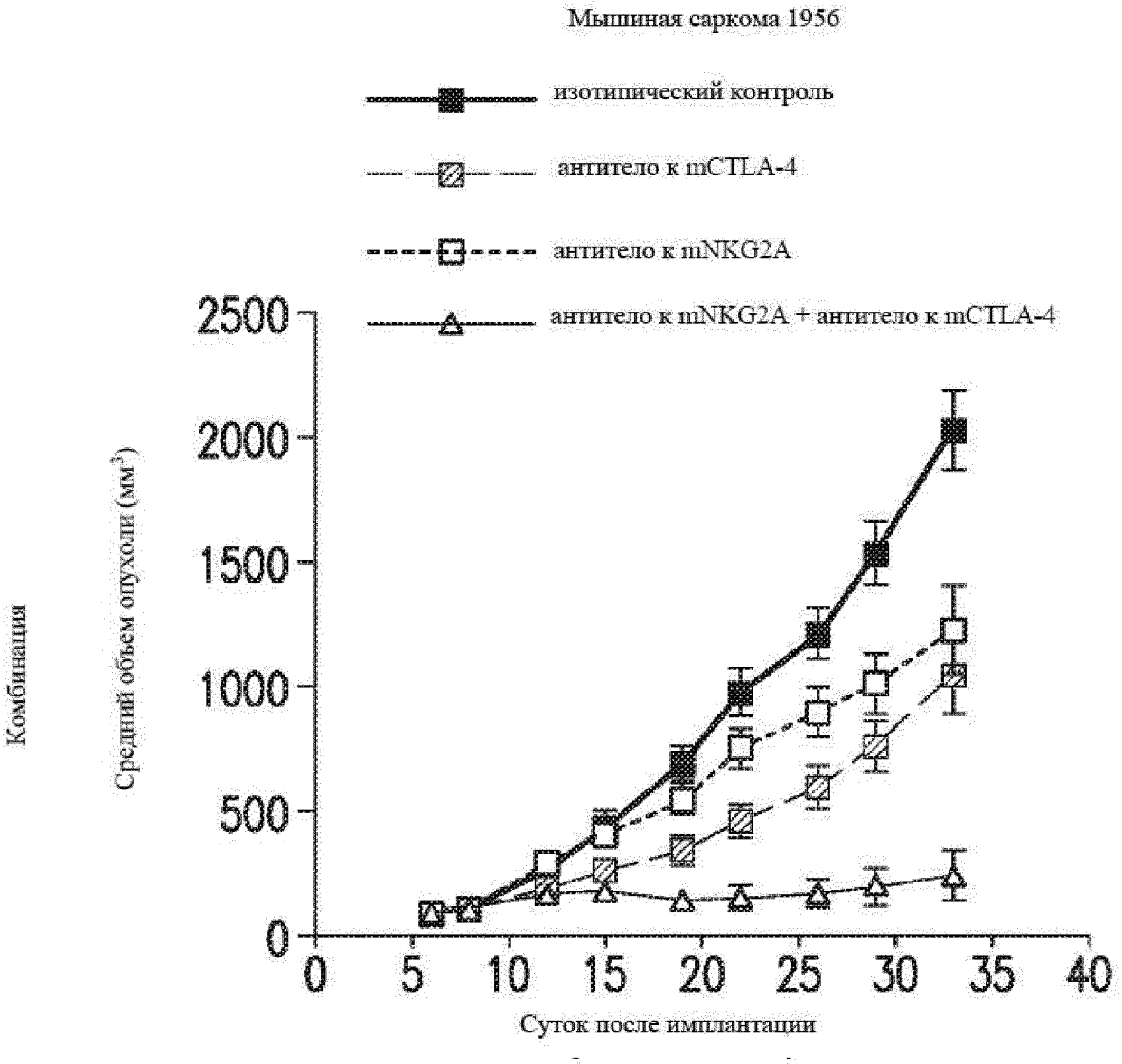
Фиг. 42B



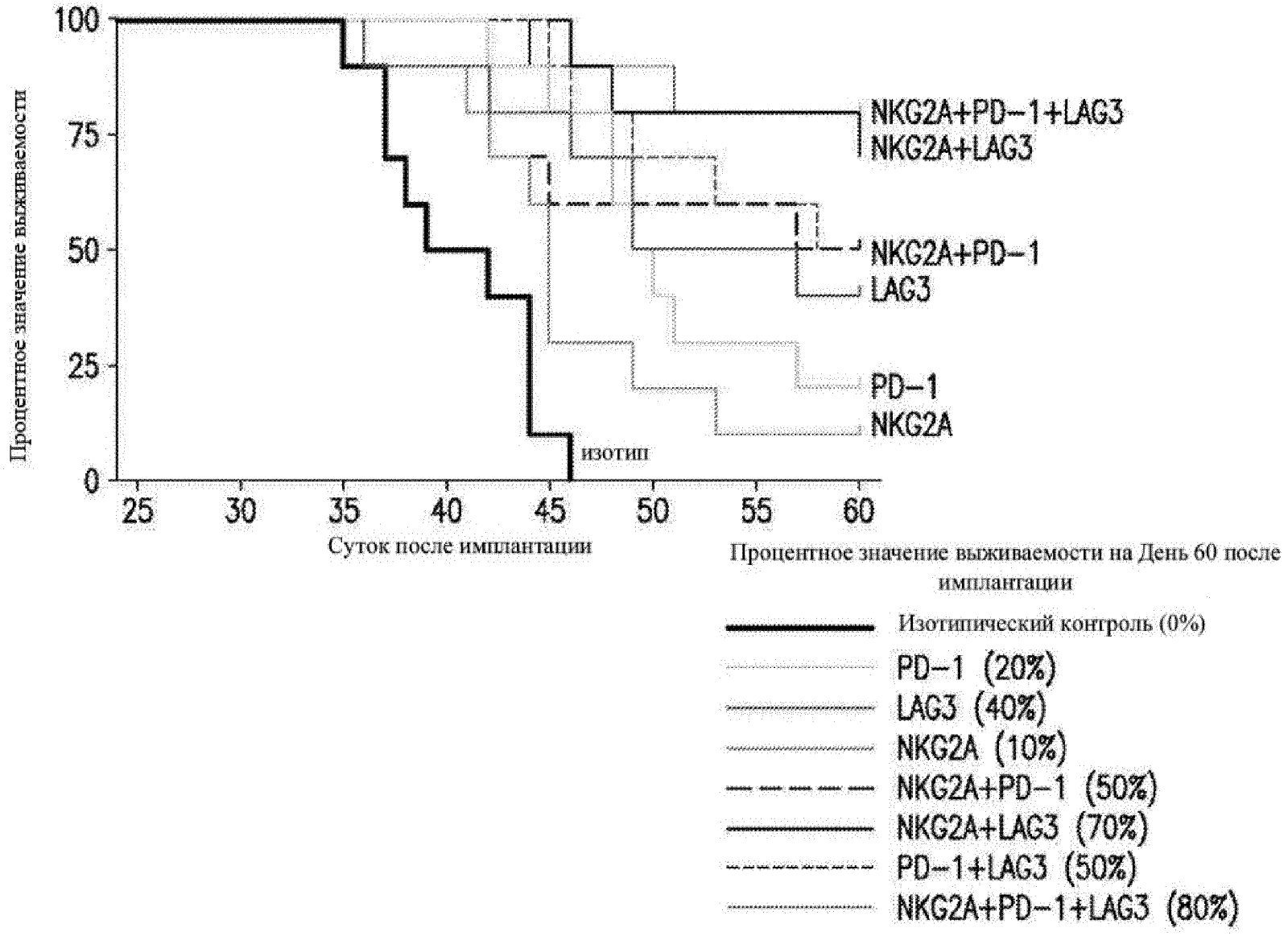
Фиг. 42C



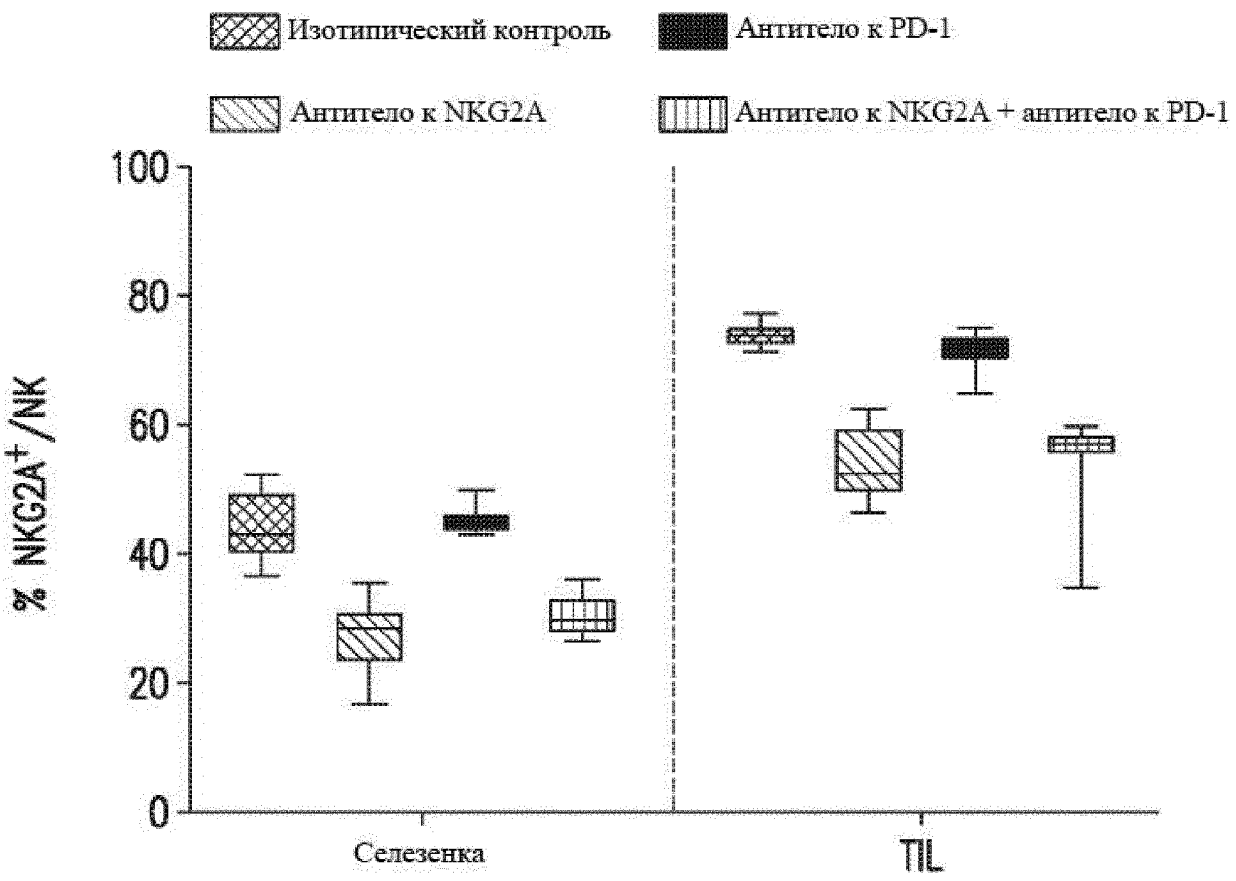
Фиг. 42D


Мышиная саркома 1956
изотипический контроль
антитело к mCTLA-4
антитело к mNKG2A
антитело к mNKG2A + антитело к mCTLA-4
Комбинация
Средний объем опухоли (мм³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Суток после имплантации

Фиг. 42E

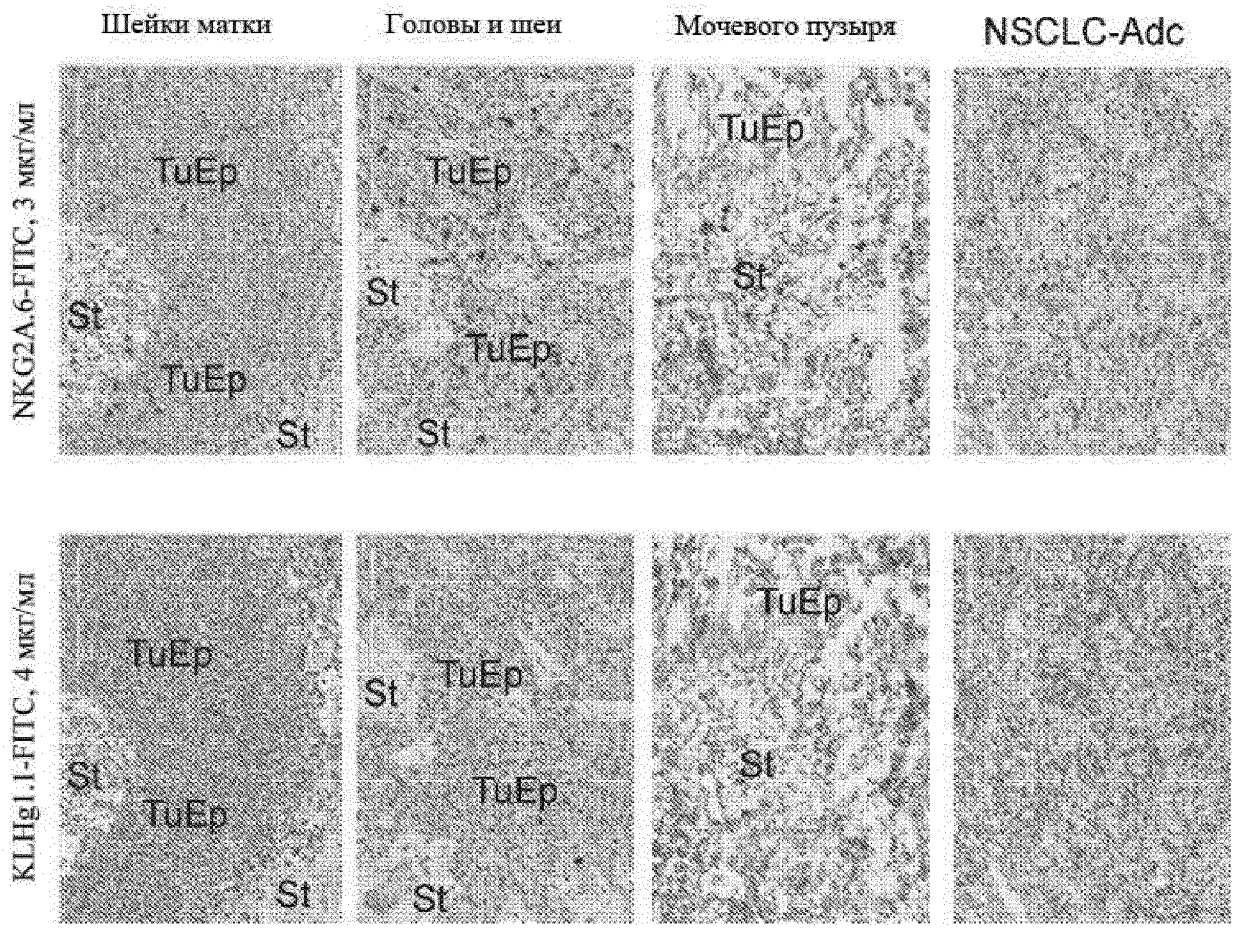

Процентное значение выживаемости
100
75
50
25
0
25
30
35
40
45
50
55
60
Суток после имплантации
NKG2A+PD-1+LAG3
NKG2A+LAG3
NKG2A+PD-1
LAG3
PD-1
NKG2A
изотип
Процентное значение выживаемости на День 60 после имплантации
Изотипический контроль (0%)
PD-1 (20%)
LAG3 (40%)
NKG2A (10%)
NKG2A+PD-1 (50%)
NKG2A+LAG3 (70%)
PD-1+LAG3 (50%)
NKG2A+PD-1+LAG3 (80%)

Фиг. 43

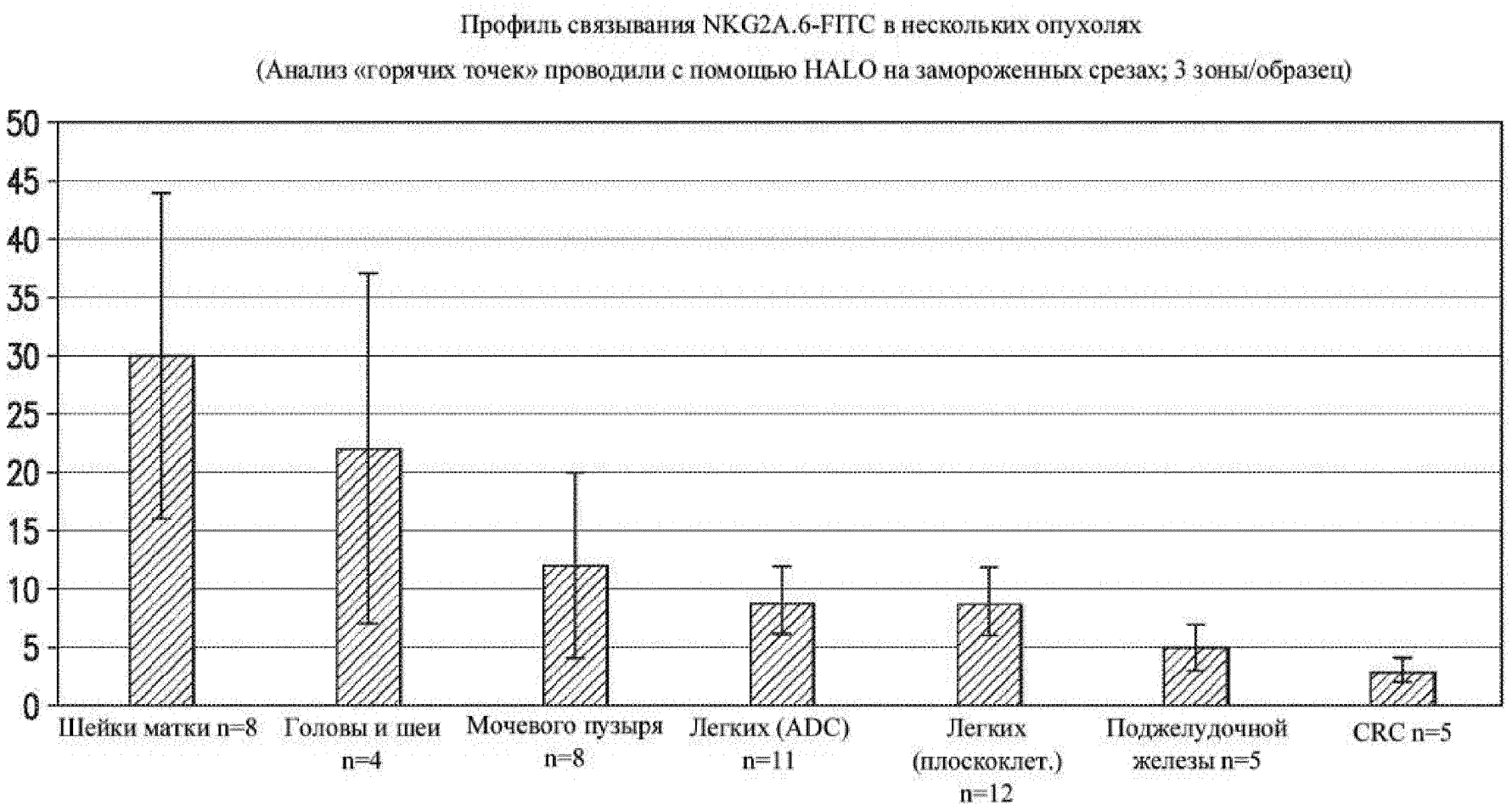

Изотипический контроль
Антитело к PD-1
Антитело к NKG2A
Антитело к NKG2A + антитело к PD-1
% NKG2A+/NK
100
80
60
40
20
0
Селезенка
TIL

Фиг. 44

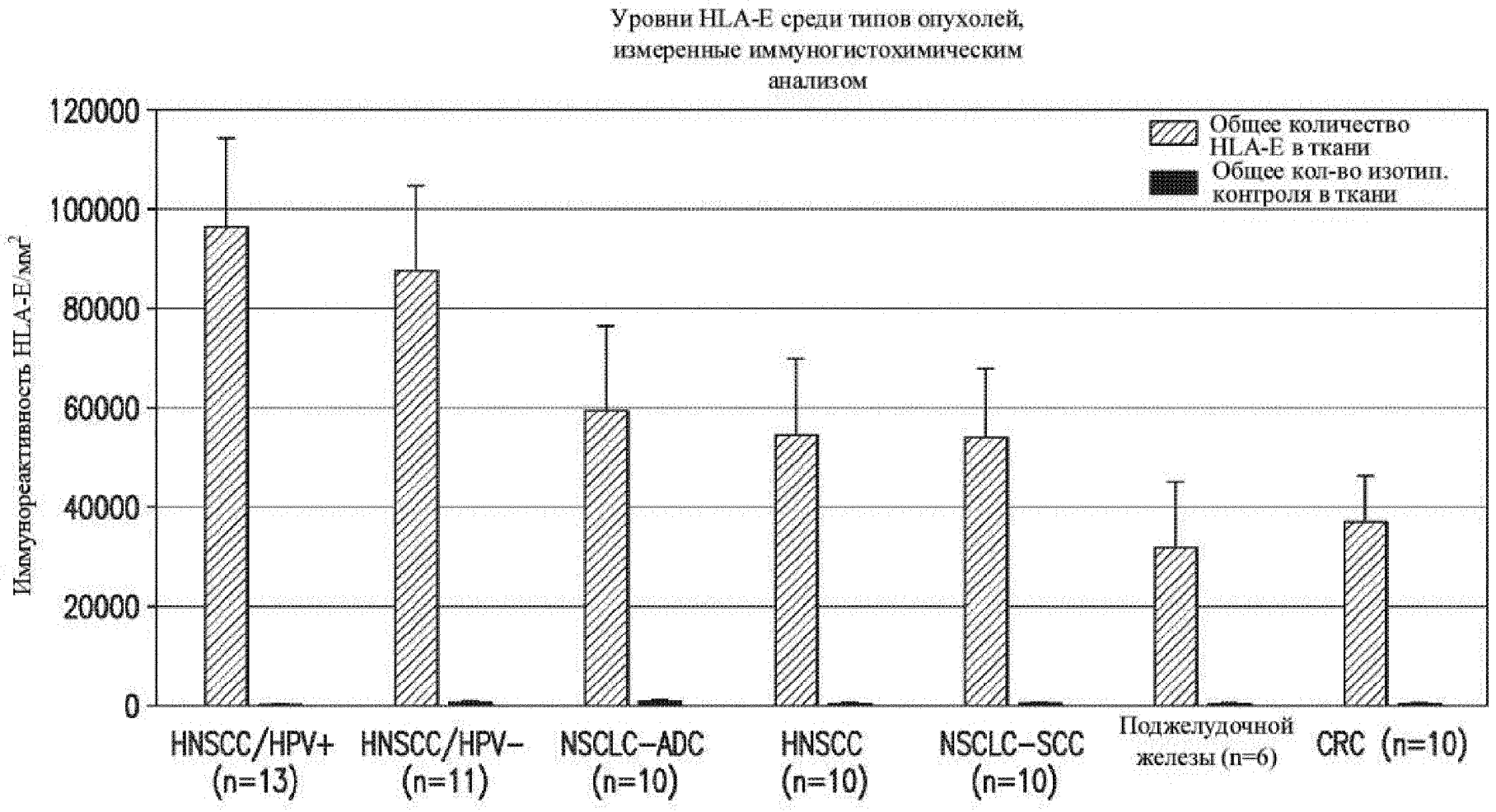
Экспрессия NKG2A в опухолях человека с помощью иммуногистохимического анализа



Фиг. 45

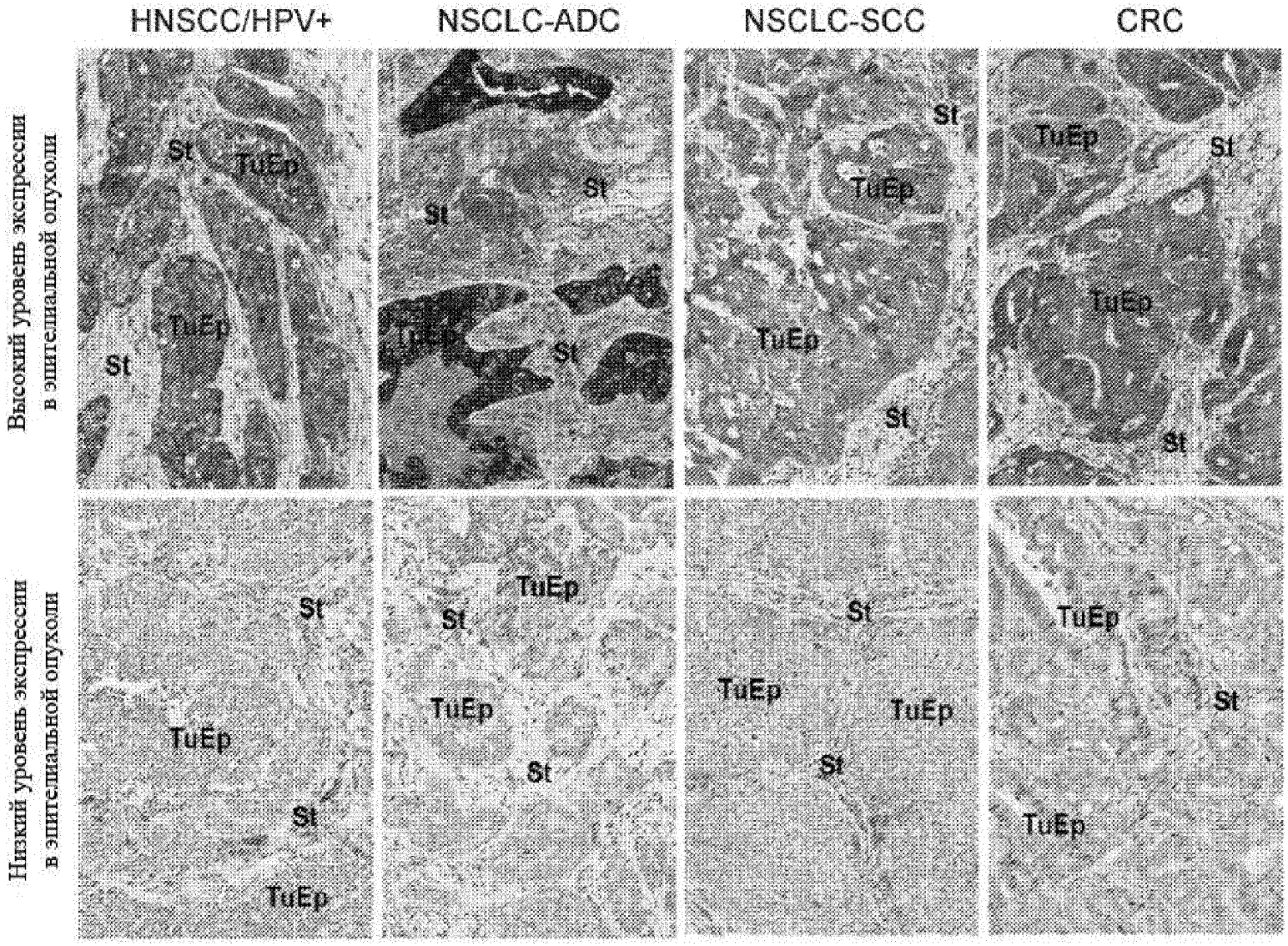

Профиль связывания NKG2A.6-FITC в нескольких опухолях
(Анализ «горячих точек» проводили с помощью HALO на замороженных срезах; 3 зоны/образец)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Шейки матки n=8
Головы и шеи n=4
Мочевого пузыря n=8
Легких (ADC) n=11
Легких (плоскоклет.) n=12
Поджелудочной железы n=5
CRC n=5

Фиг. 46


Уровни HLA-E среди типов опухолей, измеренные иммуногистохимическим анализом
Иммунореактивность HLA-E/мм2
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Общее количество HLA-E в ткани
Общее кол-во изотип. контроля в ткани
HNSCC/HPV+ (n=13)
HNSCC/HPV− (n=11)
NSCLC−ADC (n=10)
HNSCC (n=10)
NSCLC−SCC (n=10)
Поджелудочной железы (n=6)
CRC (n=10)

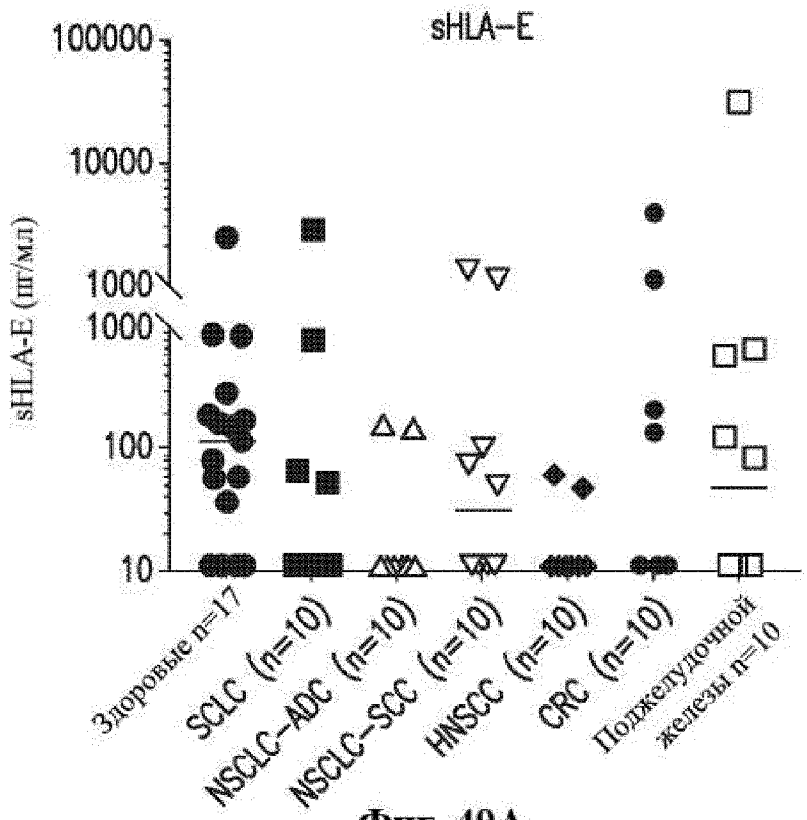
Фиг. 47

Экспрессия HLA-E в нескольких типах опухолей с помощью иммуногистохимического анализа



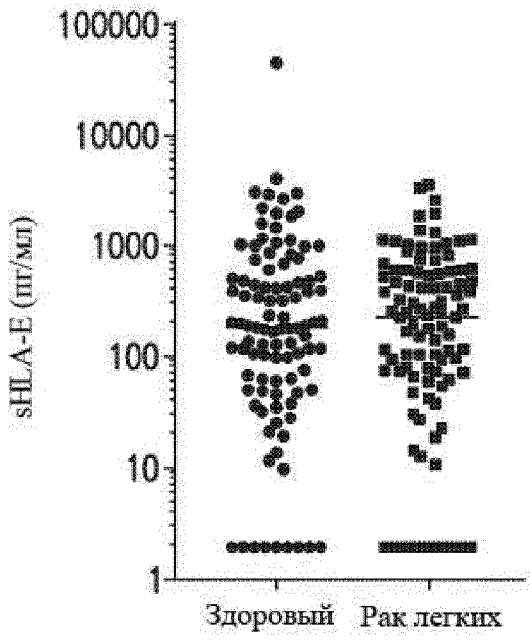
Фиг. 48

Уровни растворимого HLA-E среди здоровых контролей и пациентов с раком



Фиг. 49A

Уровни растворимого HLA-E среди здоровых контролей и пациентов с раком

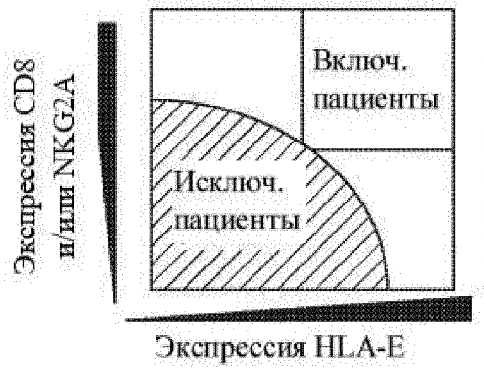


Фиг. 49B

Клиническая разработка антитела к NKG2A

Отбор пациентов:

Отбор пациент, например, с высоким уровнем экспрессии CD8, NKG2A и/или HLA-E



Для включения, например:

- Пациенты с NKG2A+ (CD8) опухолями и/или HAL-E+ опухолями

Монотерапия или с ниволумабом:

Безопасность – фармакодинамика – доказательство механизма (POM), предметное

Монотерапия антителом к NKG2A

Терапия антителом к NKG2A + ниволумаб

Рекомендованная по POM доза на 2-й фазе

PD опухоли

Для оценки фармакодинамики (PD) опухоли, например:

- Маркеры взаимодействия с мишенью
- Занятость рецепторов
- Маркеры активации Т-клеток
- Экспрессия на поверхности INKG2A
- Уровни HLA-E в сыворотке

Дальнейшая разработка антитела к NKG2A с ниволумабом, если наблюдается трансформационный сигнал

Комбинация антитела к NKG2A с другими иммуноонкологическими (IO) средствами и/или химиотерапией:

Комбинации могут различаться в зависимости от типа опухоли

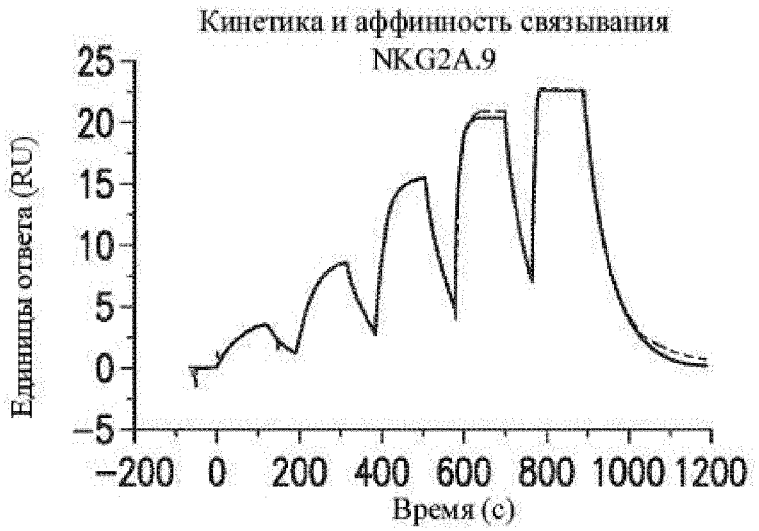
Тройная/четверная комбинация A – ниволумаб, - антитело к NKG2A и IO средство A

Тройная/четверная комбинация B – ниволумаб, - антитело к NKG2A и IO средство B

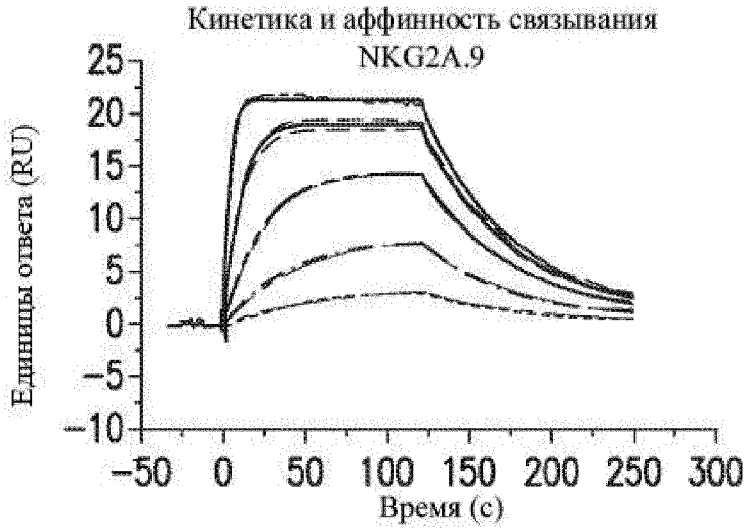
Тройная/четверная комбинация C – ниволумаб, - антитело к NKG2A и химиотерапия. В соответствии с другими вариантами осуществления с четырьмя или более средствами.

Тройная/четверная комбинация D – ниволумаб, - антитело к NKG2A, химиотерапия и/или другое IO средство. В соответствии с другими вариантами осуществления с четырьмя или более средствами.

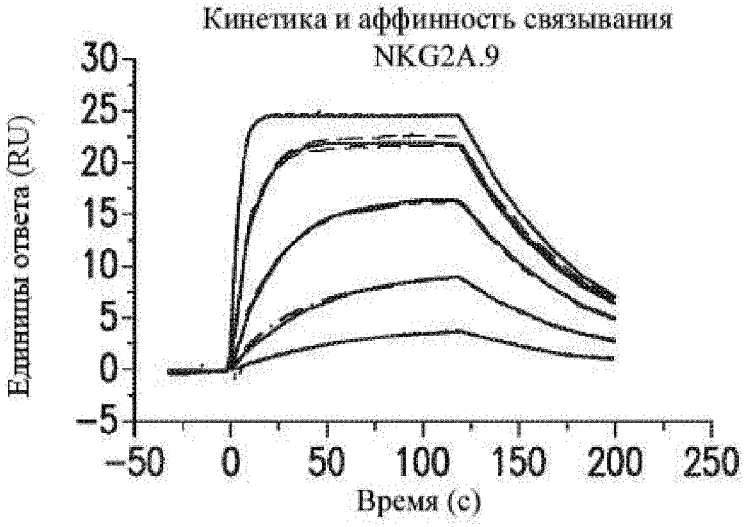
Фиг. 50



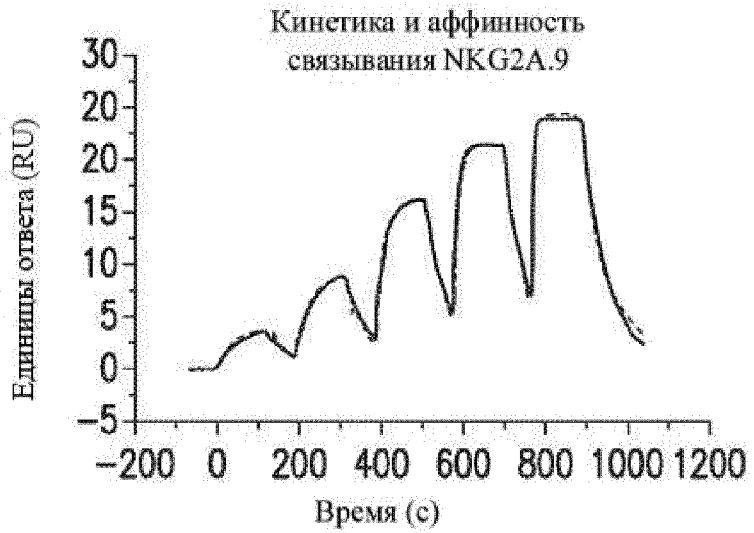
Фиг. 51A



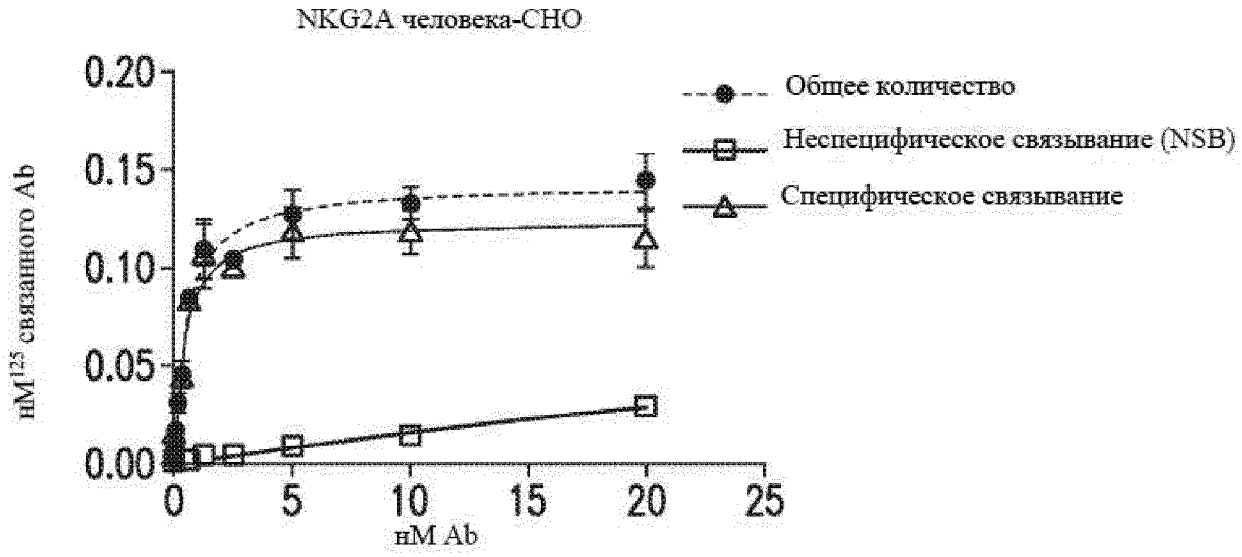
Фиг. 51B



Фиг. 51C



Фиг. 51D

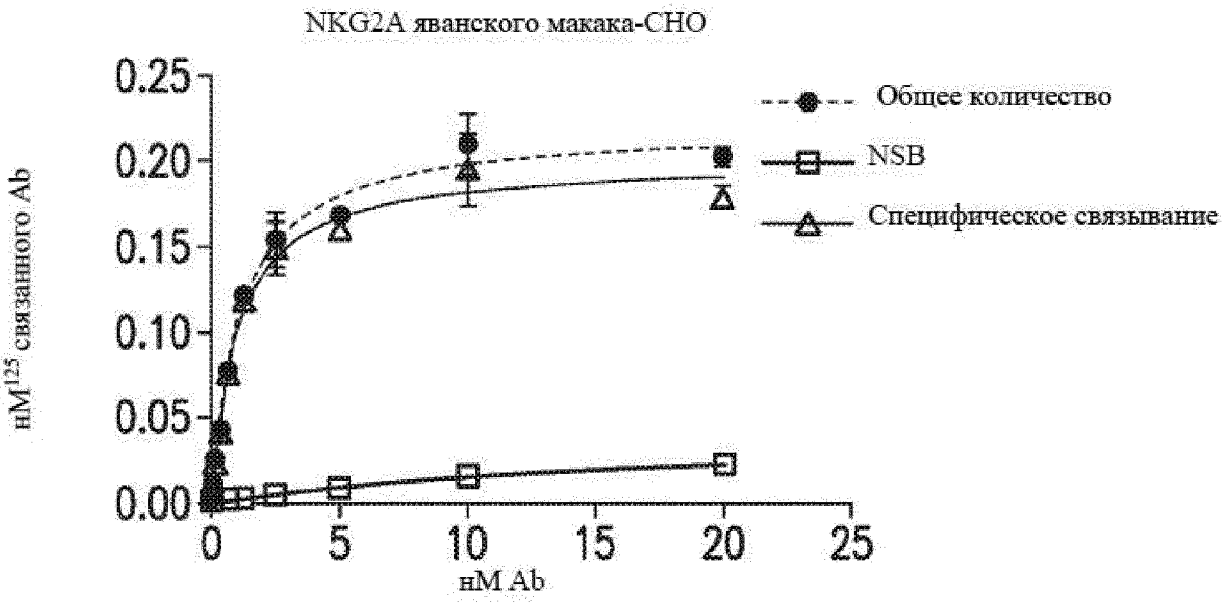


	Общее количество	NSB	Специфическое связывание
Bmax (нМ)	0.1	0.2	0.1
Kd (нМ)	0.5	79	0.4

Рецепторов на клетку = Bmax* 6×10^{10}/50000
= 148680 рецепторов на клетку

Фиг. 52A

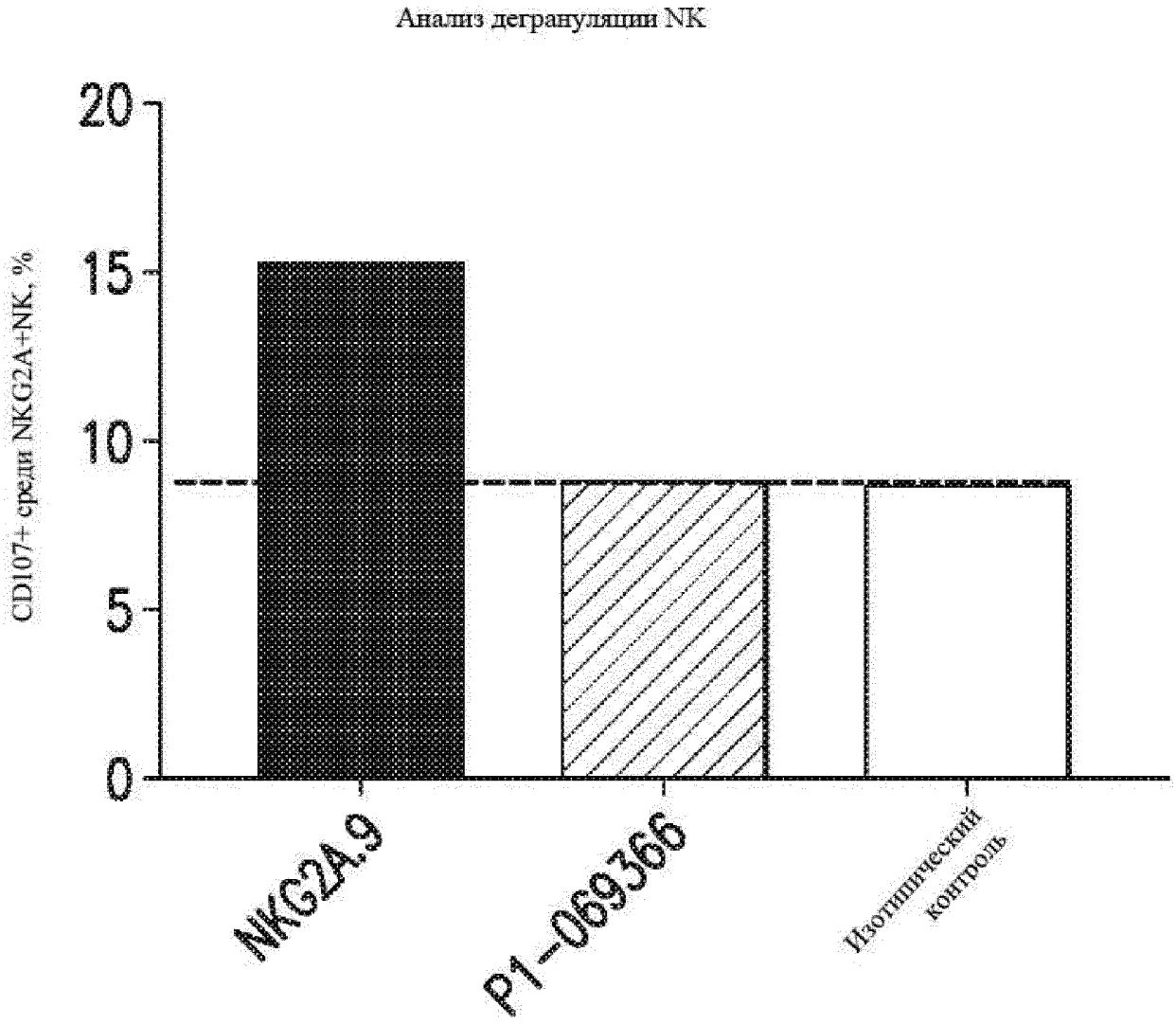
Аффинность связывания NKG2A.9 с экспрессирующими NKG2A человека и яванского макака клетками CHO с помощью анализа Скэтчарда



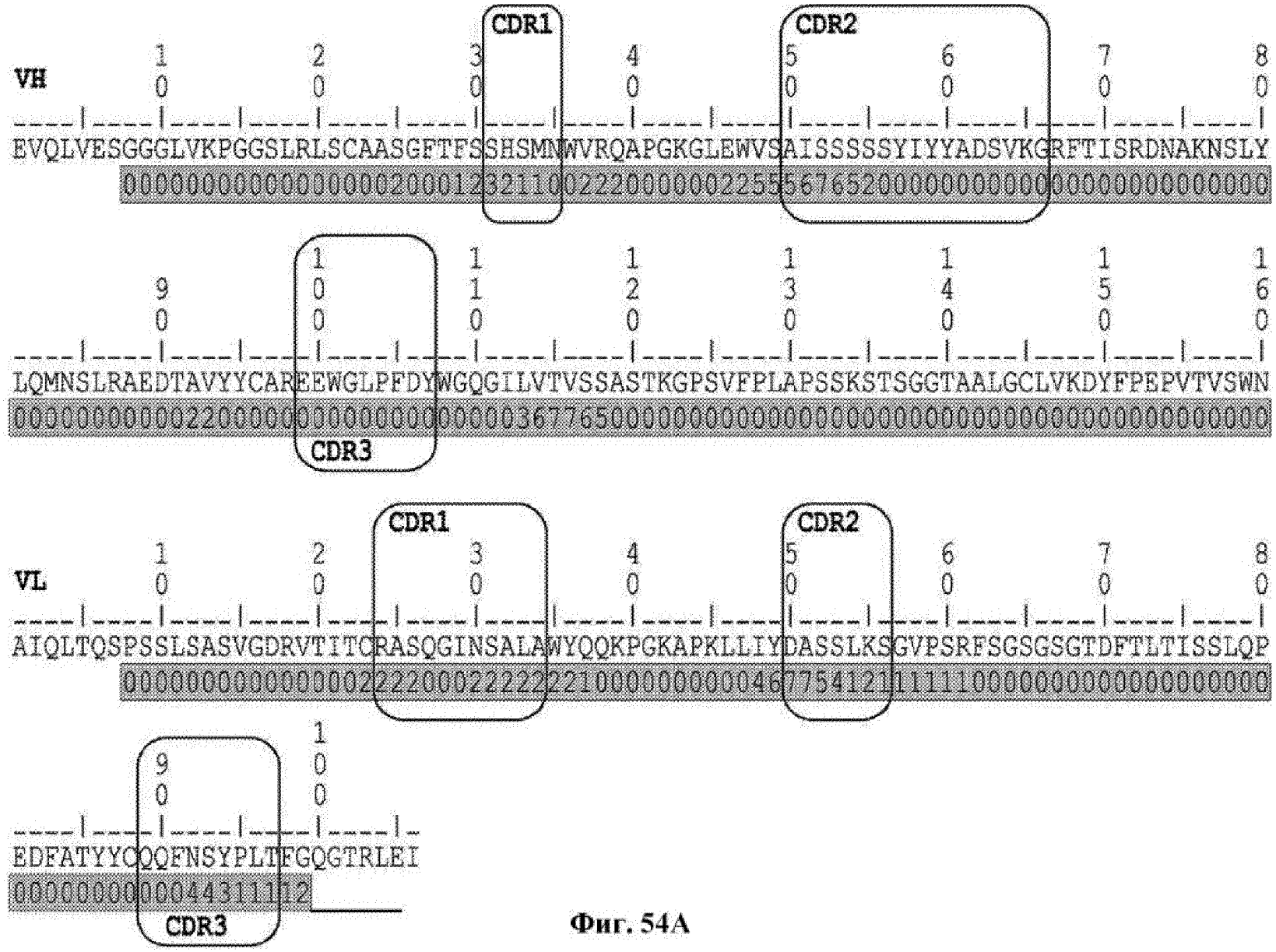
	Общее количество	NSB	Специфическое связывание
Bmax (нМ)	0.2	0.05	0.2
Kd (нМ)	1.1	19.6	1

Рецепторов на клетку = Bmax* 6×10^{10}/50000
= 240360 рецепторов на клетку

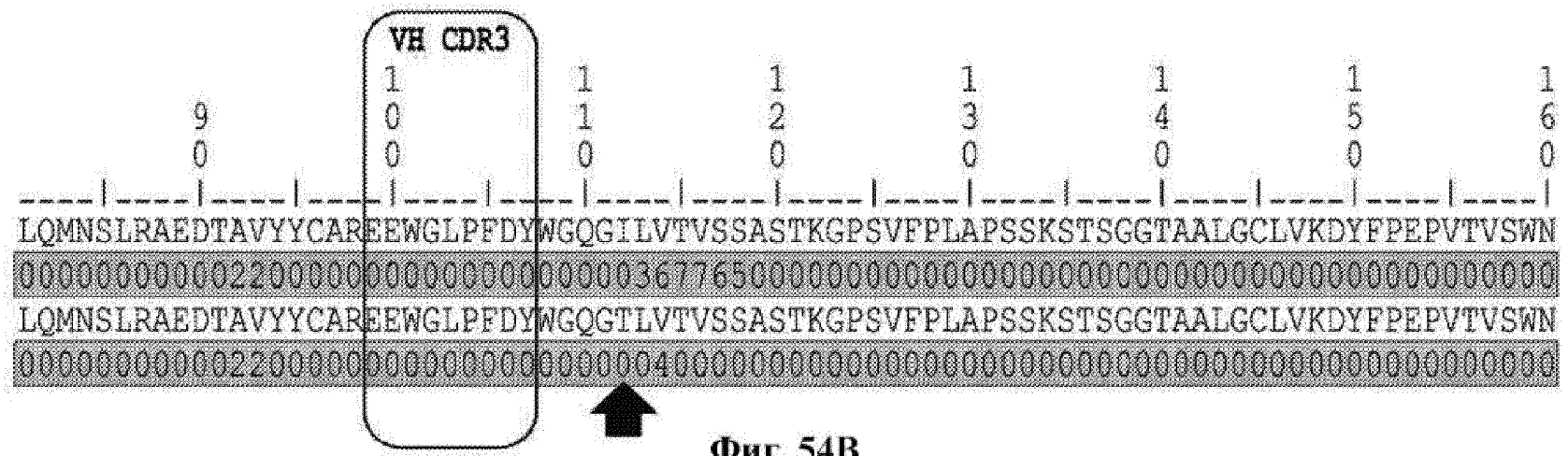
Фиг. 52B


Анализ дегрануляции NK
CD107+ среди NKG2A+NK, %
20
15
10
5
0
NKG2A.9
P1-069366
Изотипический контроль

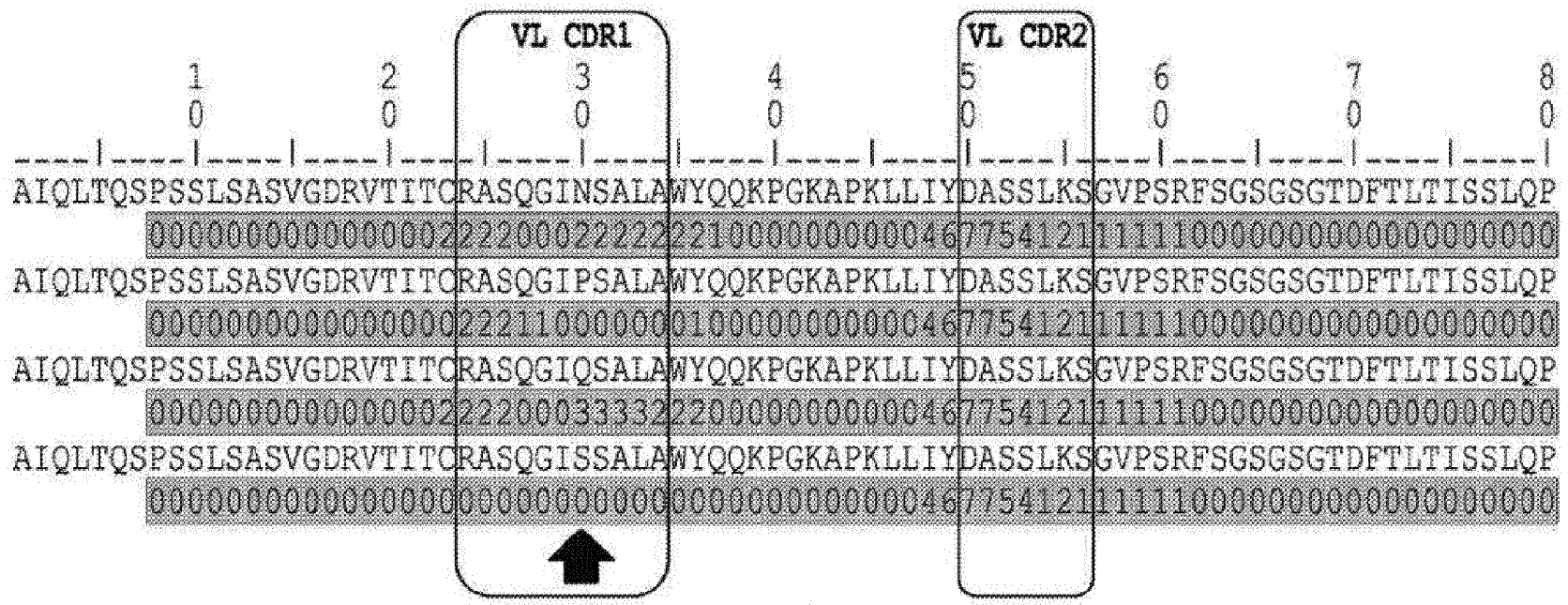
Фиг. 53


CDR1
CDR2
VH
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAREEWGLPFDYWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
CDR3
CDR1
CDR2
VL
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGQGTRLEI
CDR3

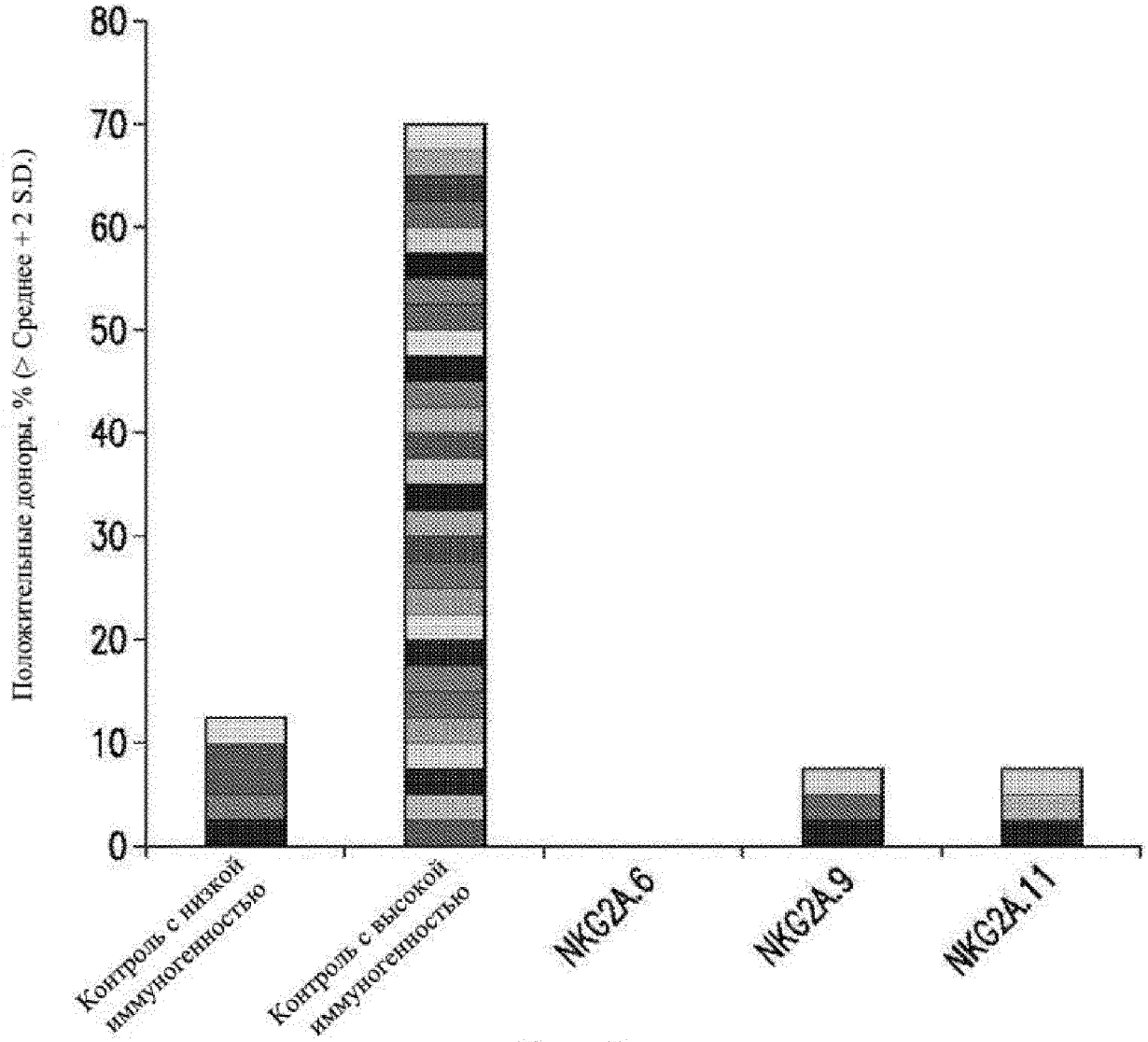
Фиг. 54A



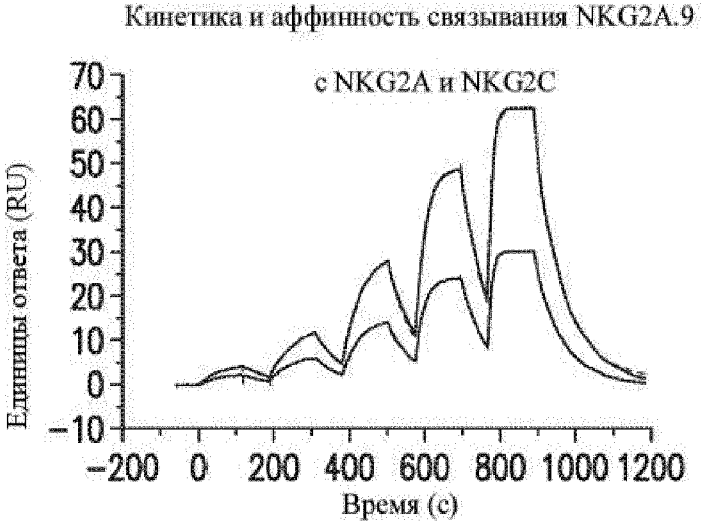
Фиг. 54B



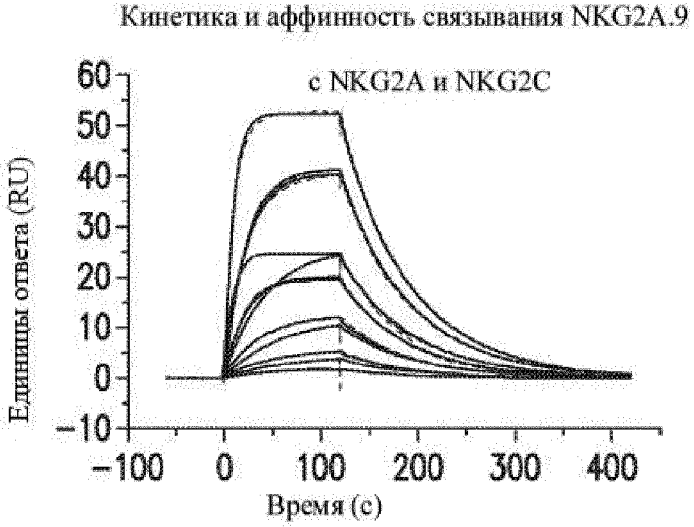
Фиг. 54C


Положительные доноры, % (> Среднее + 2 S.D.)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Контроль с низкой иммуногенностью
Контроль с высокой иммуногенностью
NKG2A.6
NKG2A.9
NKG2A.11

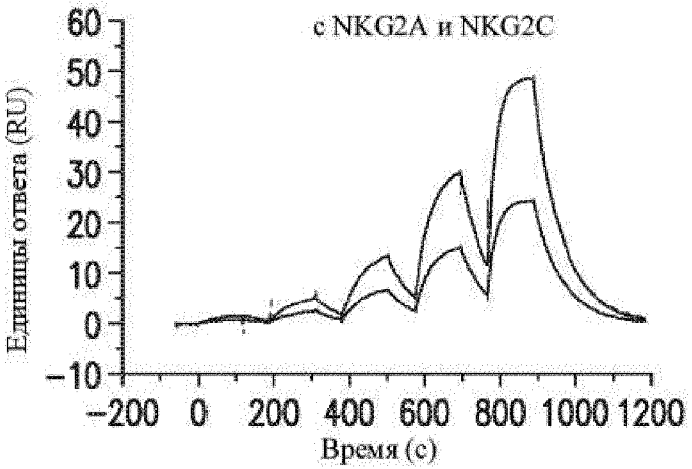
Фиг. 55



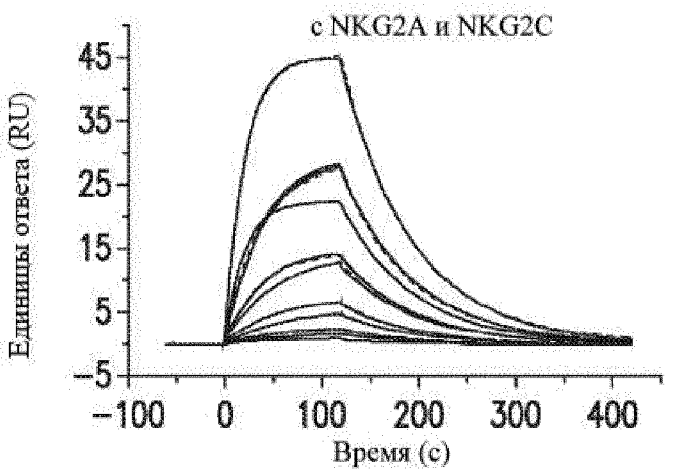
Фиг. 56A



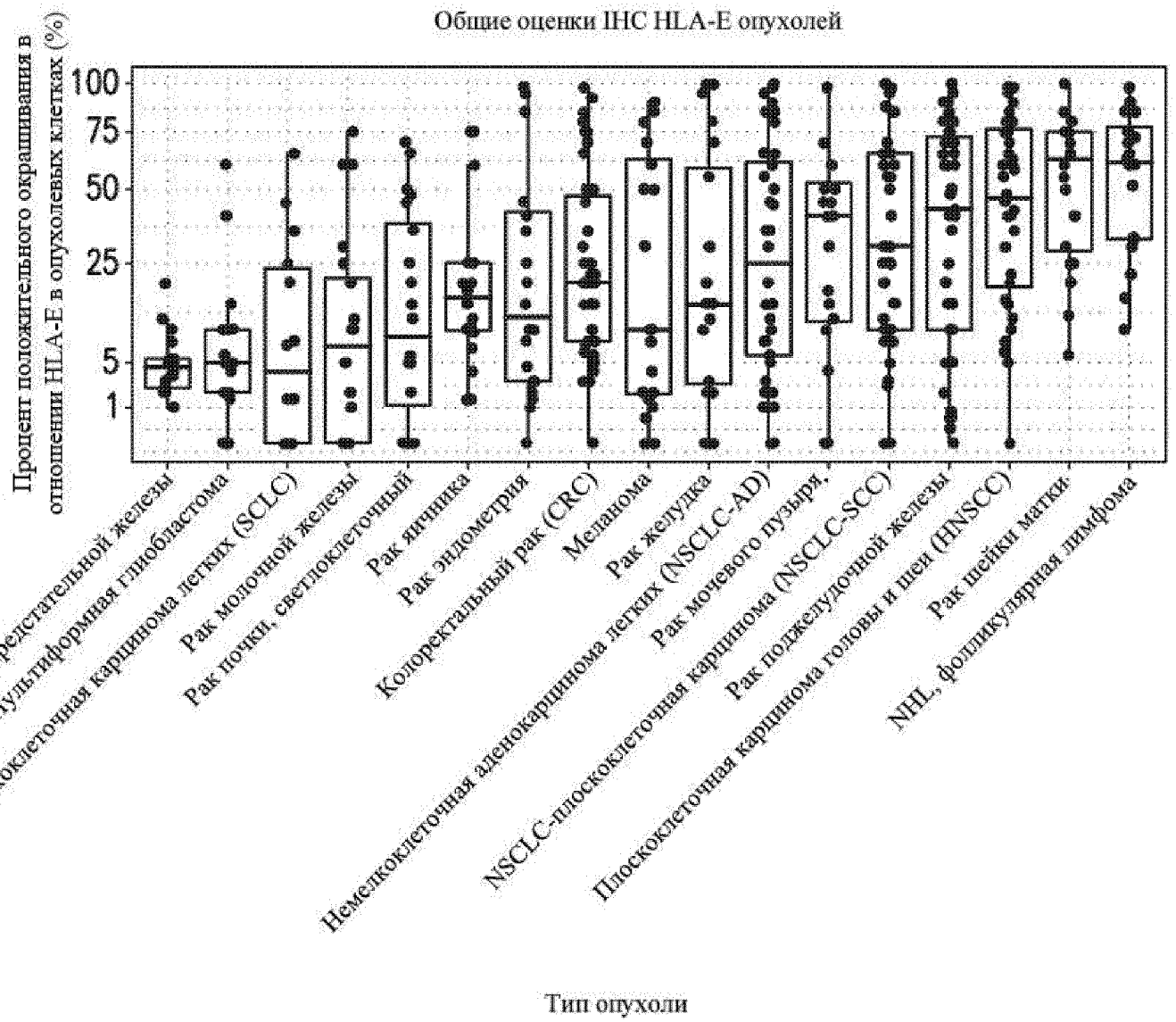
Фиг. 56B



Фиг. 56C



Фиг. 56D


Общие оценки IHC HLA-E опухолей
Процент положительного окрашивания в отношении HLA-E в опухолевых клетках (%)
100
75
50
25
5
1
Рак предстательной железы
Мультиформная глиобластома
Мелкоклеточная карцинома легких (SCLC)
Рак молочной железы
Рак почки, светлоклеточный
Рак яичника
Рак эндометрия
Колоректальный рак (CRC)
Меланома
Рак желудка
Немелкоклеточная аденокарцинома легких (NSCLC-AD)
Рак мочевого пузыря,
NSCLC-плоскоклеточная карцинома (NSCLC-SCC)
Рак поджелудочной железы
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC)
Рак шейки матки
NHL, фолликулярная лимфома
Тип опухоли

Фиг. 57