

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043548**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.31**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201892793**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.02**

---

**(54) АНТИ-HLA-G СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА**

---

**(31)** **16305650.0**

**(32)** **2016.06.03**

**(33)** **EP**

**(43)** **2019.06.28**

**(86)** **PCT/EP2017/063503**

**(87)** **WO 2017/207775 2017.12.07**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИНВЕКТИС (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ланглад Демуайен Пьер, Юэ Тьерри,  
Комартэн Жюльен, Лусто Мария, Узб  
Мария (FR)**

**(74)** Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

**(56)** **WO-A1-2014072534**

SHIROISHI MITSUNORI ET AL.: "Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 100, № 15, 22 July 2003 (2003-07-22), pages 8856-8861, XP002437412, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1431057100, see e.g. figure 3 and its corresponding figure legend

**WO-A1-9631604**

BENSUSSAN A ET AL.: "DETECTION OF MEMBRANE-BOUND HLA-G TRANSLATED PRODUCTS WITH A SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 92, № 22, 24 October 1995 (1995-10-24), pages 10292-10296, XP002007033, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.92.22.10292, see e.g. the abstract

ZHANG XUEMEI ET AL.: "Methotrexate-loaded PLGA nanobubbles for ultrasound imaging and Synergistic Targeted therapy of residual tumor during HIFU ablation", BIOMATERIALS, vol. 35, № 19, 28 March 2014 (2014-03-28), pages 5148-5161, XP028847266, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.02.036, see e.g. the abstract

---

**(57)** Изобретение имеет отношение к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, направленным против белка человеческого лейкоцитарного антигена-G (HLA-G) и индуцированным против иммуногенного пептида, полученного из домена  $\alpha 3$  белка HLA-G. Кроме того, изобретение имеет отношение к иммуногенному пептиду и способам получения указанного анти-HLA-G специфического антитела.

---

**B1**

**043548**

**043548**

**B1**

Настоящее изобретение имеет отношение к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, индуцированным к иммуногенному пептиду, полученному из домена  $\alpha 3$  человеческого лейкоцитарного антигена G (HLA-G).

#### Уровень техники

В злокачественном образовании основным механизмом ускользания от иммунологического надзора является экспрессия ингибирующих молекул на клеточной поверхности, нарушающая T клеточную передачу сигнала. Многие из этих ингибирующих молекул рассматриваются как иммунные контрольные точки (ICP) и имеют отношение к многочисленным ингибирующим путям, которые, как было сначала показано, предназначаются для того, чтобы сохранять аутоотолерантность и изменять продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов в периферических тканях во избежание коллатерального повреждения тканей.

HLA-G был недавно идентифицирован как ICP молекула, которая ингибирует эффекторные функции инфильтрирующих субпопуляций иммунных клеток путем взаимодействия со специфическими рецепторами и часто повышающе регулируется в опухолевых клетках (Carosella et al., 2015).

Более того, HLA-G также может быть неэкспрессирован и/или может подвергаться повышающему регулированию при патологических состояниях, таких как вирусные инфекции, аутоиммунные и воспалительные болезни или после аллотрансплантации.

Например, вирусы, такие как HCMV (цитомегаловирус человека), HSV-1 (вирус простого герпеса), RABV (вирус бешенства), HCV (вирус гепатита C), IAV (вирус гриппа A) и HIV-1 (вирус иммунодефицита человека типа I) видимо повышающе регулируют экспрессию HLA-G для того, чтобы предотвратить распознавание и разрушение инфицированных клеток клетками CTL и клетками NK. HLA-G также может контролировать ответ T клеток CD8 в отношении HIV-инфицированных клеток путем направления клеток CD8 в апоптоз и путем воздействия на их цитотоксические свойства (Tripathi и Agrawal, 2007).

HLA-G является неклассической молекулой MHC I класса, которая первоначально была идентифицирована в клетках хориокарциномы. Антигены MHC класса I включают классические антигены HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые демонстрируют три внеклеточных глобулярных домена ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  и  $\alpha_3$ ), ассоциированные с  $\beta 2$ -микроглобулином ( $\beta 2M$ ), а также неклассические антигены HLA-E, HLA-F и HLA-G.

В отличие от классических молекул MHC I класса HLA-G характеризуется

- (i) ограниченным полиморфизмом,
- (ii) ткане-ограниченной экспрессией, и
- (iii) также отличается своими функциями.

Восемь экзонов гена, кодирующего молекулы HLA-G, охватывают 4.4 т.п.о. на хромосоме 6 (Gaghty et al., 1987; Ellis et al., 1990). Экзоны 2, 3 и 4 кодируют внеклеточные домены  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  и  $\alpha_3$  соответственно. Первичный РНК-транскрипт может подвергаться альтернативному сплайсингу, что влечет за собой экспрессию семи изоформ, четыре из которых являются мембрано-связанными (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4) и три являются растворимыми (HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7). HLA-G1 и HLA-G5 являются наиболее значимыми описанными изоформами, отчасти, вероятно, ввиду ограниченных реагентов к HLA-G, таких как антитела. Их структуры являются типичными для классических молекул HLA класса I: тяжелая цепь, состоящая из трех внеклеточных глобулярных доменов, нековалентно связанных с  $\beta 2$ -микроглобулином ( $\beta 2M$ ) и пептидом, тогда как другие изоформы являются более короткими, утратившими один или два глобулярных домена тяжелой цепи, и без соединения с  $\beta 2M$ .

Иммуно-ингибирующая активность HLA-G происходит за счет специфического связывания с тремя ингибирующими рецепторами: лейкоцитарным иммуноглобулинподобным рецептором B1 (LILRB1/ILT2/CD85j), LILRB2 (ILT4/CD85d) и KIR2DL4 (или CD158d).

Посредством взаимодействия с этими рецепторами и в противоположность классическим молекулам MHC I класса HLA-G функционирует как супрессор (понижающий регулятор) основных функций иммунной системы, и до настоящего времени не было сообщений ни о стимулирующих функциях, ни об ответах, направленных против аллогенного HLA-G (Carosella et al., 2008a).

Аналогично другим молекулам MHC класса I LILRB-рецепторы взаимодействуют с доменом  $\alpha 3$  HLA-G. Рецептор LILRB1 экспрессируется на В клетках, некоторых Т клетках, некоторых NK клетках и на всех APC (моноцитах и дендритных клетках), в то время как LILRB2 экспрессия ограничивается миелоидным ростком, и он экспрессируется только на моноцитах и дендритных клетках.

LILRB1 и LILRB2 рецепторы связываются с целым рядом классических MHC молекул посредством комплекса  $\alpha 3$  домен/ $\beta 2M$  или одного  $\alpha 3$  домена соответственно. Действительно LILRB1 связывается только с  $\beta 2M$ -ассоциированными HLA-G комплексами, тогда как LILRB2 распознает и  $\beta 2M$ -ассоциированные и  $\beta 2M$ -свободные молекулы HLA-G, а также укороченные изоформы с доменами  $\alpha 1$ - $\alpha 3$ .

HLA-G является лигандом с самым высоким сродством в отношении LILRB2 рецептора по сравнению с классическими молекулами MHC класса I. Более высокое сродство HLA-G для LILRB1 и LILRB2 рецепторов, в частности, иллюстрируется тем фактом, что HLA-G, обнаруживаемый на поверхности опухолевых клеток, способен вступать в контакт с LILRB1 и/или LILRB2 рецепторами, даже если клас-

сические молекулы МНС класса I также экспрессируются на их поверхности. Этого предпочтительного взаимодействия HLA-G с LILRB рецепторами достаточно для того, чтобы ингибировать цитолитические функции иммунных эффекторных клеток.

LILRB1 и 2 рецепторы не связываются с аналогичными HLA-G формами и показывают более высокую аффинность к HLA-G-мультимерам, чем мономерным структурам (HoWangYin et al., 2012). Было показано, что это более высокое сродство LIRB рецепторов к HLA-G связано с присутствием ароматических аминокислот Phe195 и Tyr197 в  $\alpha 3$  домене HLA-G, которые не присутствуют в классических молекулах МНС I класса.

Значимость HLA-G экспрессии как механизма ускользания, используемого опухолевыми клетками для ингибирования эффекторных клеток, была в значительной степени продемонстрирована (Loustau et al., 2013). Было разработано несколько подходов "нацеливания" на HLA-G с целью содействия отторжению опухолевой клетки (Carosella et al., 2008b; Yan, 2011). Было создано несколько анти-HLA-G антител, и только одно блокирующее антитело является доступным (87G) (Blaschitz et al., 2000; Menier et al., 2003). Это моноклональное антитело, 87G, взаимодействует с  $\alpha 1$  доменом тяжелой цепи HLA-G, связанного с  $\beta 2M$ . Даже несмотря на то что оно было описано, как способное нейтрализовать HLA-G и, следовательно, восстановить отторжение опухоли *in vitro* и *in vivo* (Agaugue et al., 2011), его применимость оказывается под вопросом, в связи с тем, что HLA-G часто экспрессируется в виде  $\beta 2M$ -свободной полноразмерной молекулы или укороченных изоформ. Эти различные изоформы также могут связывать ингибиторный рецептор LILRB2.

Иммунизация HLA-G невероятно трудна, давая в результате незначительное количество специфических антител. Причины этой неспособности к выработке нейтрализующих антител были объяснены. На пациентах с трансплантированной почкой было продемонстрировано, что присутствие HLA-G препятствует выработке антител (Qiu et al., 2006). Недавние исследования *in vitro* подтвердили, что HLA-G/LILRB1 взаимодействие нарушает созревание В-клеток и выработку антител у людей (Naji et al., 2014). Также известно, что HLA-G демонстрирует толерогенную функцию у мышей вида, обычно используемого для получения моноклональных антител (Favier et al., 2001).

HLA-G взаимодействует с PIR-B рецептором, который экспрессируется в мышинных В-клетках и является функционально гомологичным человеческим LILRB1 и LILRB2 (Liang et al., 2002). HLA-G/PIR-B взаимодействие может привести к ингибированию В-клеток, таким образом предотвращая выработку антител у мыши.

Было создано моноклональное антитело, очевидно направленное на  $\alpha 3$  домен классических молекул МНС класса I, получившее название TP25.99 (Tanabe et al., 1992). Однако другие исследователи показали, что оно не связывается с доменом  $\alpha 3$  HLA-G (Desai et al., 2000; Moy et al., 2000). Это несоответствие можно объяснить гидрофобными характеристиками домена  $\alpha 3$  HLA-G, которые являются неблагоприятными для продуцирования антител.

Несмотря на то что международная патентная заявка WO2014/072534 предлагает способ получения и обнаружения анти-HLA-G антитела путем ДНК-иммунизации с использованием целого домена  $\alpha 3$  HLA-G, все еще существует необходимость в анти-HLA-G антителах, распознающих все HLA-G изоформы и демонстрирующих улучшенную специфичность в отношении HLA-G.

#### **Раскрытие изобретения**

В настоящее время изобретатели добились успеха в преодолении трудностей в отношении получения специфических анти-HLA-G антител за счет конструирования иммуногенного пептида из домена  $\alpha 3$  белка HLA-G.

Первой целью изобретения является выделенный пептид, состоящий из последовательности X1-TNHPVFDYEATLR-X2 (SEQ ID NO: 49), в которой X1 отсутствует или является цистеином, валином или является последовательностью, выбранной из группы, состоящей из KTHV (SEQ ID NO: 50) или SKTHV (SEQ ID NO: 51), и X2 отсутствует или является цистеином.

Такой пептид используется в качестве иммуногена для продуцирования антител, специфических в отношении домена  $\alpha 3$  изоформ белка HLA-G, предпочтительно моноклональных антител.

Другой целью изобретения является анти-HLA-G антитело, предпочтительно моноклональное антитело, которое специфически распознает пептид, как определено в настоящем документе.

Антитело может быть полноразмерным антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или биспецифическим антителом.

Дополнительной целью изобретения является композиция, содержащая такое антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

Другим предметом изобретения является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи (VH) антитела, вариабельный участок легкой цепи (VL) антитела или и тот и другой участки описанного в документе антитела.

Также предоставляется вектор, предпочтительно вектор экспрессии, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

Кроме того, дополнительно описывается клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или век-

тор.

Кроме того, предоставляются способы получения анти-HLA-G антитела. В предпочтительном варианте осуществления раскрывается способ получения анти-HLA-G моноклонального антитела, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор, при условиях, обеспечивающих возможность экспрессии антитела.

Данное антитело, нуклеиновая кислота или вектор, экспрессирующий указанное антитело, являются особенно полезными при лечении рака или вирусной инфекции.

Дополнительным предметом изобретения является применение анти-HLA-G антитела, описанного в данном документе, в диагностическом методе *in vitro* для обнаружения или мониторинга HLA-G в биологическом образце.

Дополнительно рассматриваются диагностические наборы, содержащие указанное антитело.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показан дизайн иммуногена, иммунизации и получения анти-HLA-G антител. (А) Показано выравнивание аминокислотной последовательности человеческого белка HLA-G с HLA-E, A2, B7, B44 и CW3. Предоставлено выравнивание последовательностей для трех иммуноглобулиновых доменов HLA-G:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ . Остатки, выделенные серым цветом, показывают различия с HLA-G. Участки в домене  $\alpha 3$ , участвующие в LILRB1/2 связывании, указаны черными двунаправленными стрелками. Аминокислотная последовательность HLA-G специфического PC-1 пептида подчеркнута и выделена жирным шрифтом. (В) Показана выработка анти-HLA-G антител у иммунизированной мыши. Характерные проточно-цитометрические гистограммы анти-HLA-G сывороточной реактивности у иммунизированной BALB/c мыши (черные линии/темно-серые гистограммы) и у неиммунизированной контрольной мыши (светло-серые линии и гистограммы). Пунктирные линии обозначают порог, выше которого сигналы считаются положительными. Сыворотку получали, разбавляли и инкубировали с гранулами, покрытыми HLA-G5, а затем инкубировали с FITC-конъюгированными козьими анти-мышинными IgG вторичными антителами. Флуоресценцию анализировали с помощью проточной цитометрии. Показаны четыре разбавления сыворотки. (С) Реакционную способность R4C-C3 (символы ромб/пунктирная линия) и R5C-D8 (символы кружок/пунктирная линия) scFv антитела в отношении соединенного с биотином PC1 пептида оценивали методом ELISA. ScFv антитела были серийно разведены и протестированы с помощью прямого ELISA с использованием биотин-PC1, нанесенного на микропланшеты со стрептовидиновым покрытием. Небиотинилированный-HLA-G пептид использовали в качестве контроля (символы квадрат и треугольник/жирные линии).

На фиг. 2 (А) показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельного участка легкой цепи к 15E7. Показаны положения "определяющих комплементарность областей (гиперварибельных участков)" (CDR1, CDR2 и CDR3), а также "каркасных участков" (FR1, FR2, FR3 и FR4) антитела. (В) Показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельного участка к легкой цепи 15E7 и аминокислот соответствующего гена мышинной зародышевой линии. Аминокислоты в последовательности 15E7 легкой цепи к, которая отличается от последовательности зародышевой линии, показаны жирным шрифтом. Показаны положения CDR.

На фиг. 3 (А) показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельного участка тяжелой цепи 15E7. Показаны положения последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, а также FR антитела. (В) Показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи 15E7 и аминокислот соответствующего гена мышинной зародышевой линии. Аминокислоты в последовательности 15E7 тяжелой цепи, отличающейся от последовательностей зародышевой линии, показаны жирным шрифтом. Показаны положения CDR.

На фиг. 4 (А) показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельного участка легкой цепи к scFv R4C-C3. Показаны положения CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей, а также FR scFv. (В) Показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельного участка легкой цепи к scFv R4C-C3 и аминокислот соответствующего гена мышинной зародышевой линии. Аминокислоты в последовательности scFv R4C-C3 к легкой цепи, отличающейся от последовательностей зародышевой линии, показаны жирным шрифтом. Показаны положения CDR.

На фиг. 5 (А) показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельных участков тяжелой цепи scFv антитела R4C-C3. Показаны положения последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, а также FR scFv антитела. (В) Показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельных участков тяжелой цепи scFv антитела R4C-C3 и аминокислот соответствующего гена мышинной зародышевой линии. Аминокислоты в последовательности тяжелой цепи scFv антитела R4C-C3, отличающейся от последовательностей зародышевой линии, показаны жирным шрифтом. Показаны положения CDR.

На фиг. 6 (А) показан анализ SDS-PAGE 15E7 моноклонального антитела. Дорожка 1: маркеры молекулярного веса - последовательно сверху вниз, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa и 20 kDa. Дорожка 2: мышинный IgG в качестве контроля. Дорожка 3: моноклональное антитело 15E7. Белки разделили с помощью SDS-PAGE и окрасили кумасси бриллиантовым синим. (В) Показан кинетический анализ связы-

вания моноклонального антитела 15E7 с PC-1 пептидом с использованием Blitz-системы интерферометрии биослоев. Моноклональное антитело 15E7 было иммобилизовано на чипах AR2G с помощью аминокислотного связывания. Различные концентрации PC-1 пептид/BSA (от 5 до 600 нМ) инкубировали с 15E7, связанным с поверхностью биосенсора. Анализ начинали в момент времени 30 с в течение периода времени 120 с (фаза ассоциации), после чего инкубировали только буфер в течение 100 с, чтобы зарегистрировать диссоциацию PC-1/BSA от 15E7. Левая часть пунктирной линии (на момент 150 с) показывает кинетику ассоциации, тогда как правая сторона показывает фазу диссоциации. Верхняя линия соответствует связыванию 15E7 с самой высокой концентрацией пептида (600 нМ) и нижняя линия с самой низкой концентрацией пептида (5 нМ). Связывание было пропорционально концентрации пептида (промежуточные линии).

На фиг. 7 показано дозозависимое связывание моноклонального антитела 15E7 с его мишенями: пептид cPC-1 (фиг. 7A); рекомбинантный белок HLA-G5 (фиг. 7B) или рекомбинантный белок HLA-G6 (оба белка без ассоциации с P2M) (фиг. 7C). Различные серийные концентрации 15E7 использовали для определения дозозависимой активности связывания. Обнаружение связывания осуществляли с помощью проточной цитометрии с использованием PE-конъюгированных козьих анти-мышинных антител. Связывание представлено в виде процента положительно меченых гранул с 15E7 по сравнению с окрашиванием изотипическим контролем (IgG2a).  $EC_{50}$  15E7 составляло 2 нг/мл в отношении cPC-1 пептида, 28 нг/мл в отношении HLA-G5 и 120 нг/мл в отношении HLA-G6 белков. Измерения проводили в трех повторениях ( $n=3$ ); планки погрешностей показывают SD. Черные линии показывают связывание 15E7 с гранулами, покрытыми лигандами, тогда как серые линии представляют связывание 15E7 с контрольными гранулами [гранулы, покрытые мутированным пептидом (фиг. 7A) или несвязанными гранулами (фиг. 7B и 7C)].

На фиг. 8 показано дозозависимое связывание анти-HLA-G моноклонального антитела 15E7 с  $\beta$ 2M-несвязанным HLA-G1, экспрессированным на поверхности клеток K562. Различные концентрации (0-80 мкг/мл) 15E7 использовали для определения специфической дозозависимой активности связывания 15E7 на положительных по HLA-G1 клетках (K562-G1) в сравнении с отрицательными по HLA-G контрольными клетками (K562-PV). Обнаружение 15E7 осуществляли с помощью проточной цитометрии с использованием PE-конъюгированных козьих анти-мышинных антител. 15E7 демонстрирует дозозависимое связывание на целевых клетках K562-G1 (черная линия), тогда как отсутствие связывания было установлено на контрольной клеточной линии K562-PV (серая линия).

На фиг. 9 показано исследование методом проточной цитометрии поверхностных HLA-G антигенов на необработанных или обработанных кислотой клетках K562-G1 и K562-PV (A, B) и клетках JEG-3 (C). Поверхностные антигены HLA-G исследовали с помощью следующих mAbs: MEM-G/9 (специфичные к природному комплексу HLA-G), анти- $\beta$ 2M и 15E7. Гистограммы: светло-серый - неокрашенные; серый - изотипические контроли (IgM для анти- $\beta$ 2M, IgG2a для 15E7 mAb и IgG1 для 4H84); темно-серый; соответствуют антителу.

На фиг. 10 показано моноклональное антитело 15E7 специфически связывается с HLA-G и не связывается с классическими молекулами MHC I класса. Анализы связывания, оценивающие специфичность 15E7, были проведены с использованием клеточных линий лимфомы (LCL DES, LCL BRO и RPMI8866), экспрессирующих классические молекулы MHC I класса человека на своей поверхности, но не HLA-G, и проанализированы с помощью проточной цитометрии. 15E7 использовали в конечной концентрации 20 мкг/мл. Связывание представлено в виде процента положительно окрашенных клеток с 15E7 по сравнению с изотипическим контролем (IgG2a). Клетки K562-G1 и K562-PV использовали в качестве положительного и отрицательного контролей соответственно.

#### **Подробное описание изобретения**

Отсутствие терапевтических и диагностических антител к HLA-G объясняется толерогенным действием HLA-G на созревание В-клеток и секрецию антител. Изобретателям удалось обойти это ингибирование за счет использования пептида, полученного из домена HLA-G- $\alpha$ 3, который был способен индуцировать анти-HLA-G специфические антитела.

Настоящее изобретение предоставляет анти-HLA-G моноклональные антитела, которые специфически связываются с HLA-G и которые демонстрируют некоторые желательные характеристики. Действительно полученные анти-HLA-G антитела прочно связываются как с рекомбинантными, так и эндогенными белками HLA-G при отсутствии перекрестной специфичности с классическими MHC молекулами I класса.

Изобретение также имеет отношение к применению таких антител для возвращения в исходное состояние иммунной системы из состояния, обусловленного патологической экспрессией HLA-G на поверхности некоторых клеток пациента. Соответственно антитела являются пригодными для того, чтобы лечить или облегчить состояние, диагностированное у пациентов, в тех случаях, когда указанное состояние получает выгоду от подавления (понижающей регуляции) иммунной системы у пациента, вследствие присутствия HLA-G-белков. Антитела изобретения также могут использоваться для диагностики и мониторинга состояния у пациента.

### Определения

Антитело "специфически связывается" с антигеном-мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или в течение более длительного времени, чем оно связывается с другими субстанциями. Термин "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не предусматривает исключительно (хотя может включать) эксклюзивное связывание. Как правило, но не обязательно упоминание связывания означает преимущественное связывание. Аффинность связывания определяется константами скорости ассоциации и диссоциации, или  $K_D$  (равновесная диссоциация). В большинстве случаев специфическое связывание при использовании в отношении антитела относится к антителу, которое специфически связывается с ("распознает") его мишенью(ями) со значением аффинности ( $K_D$ ) менее чем  $10^{-8}$  М, например менее чем  $10^{-9}$  или  $10^{-10}$  М. Более низкое значение  $K_D$  представляет более высокую аффинность связывания (т.е. более сильное связывание), так что значение  $K_D$   $10^{-9}$  М показывает более высокую аффинность связывания, чем значение  $K_D$   $10^{-8}$  М.

В контексте настоящего изобретения "связывание белка HLA-G" антителами или антигенсвязывающими фрагментами изобретения означает, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты изобретения распознают изоформы белка HLA-G, имеющие домен  $\alpha 3$  или, как уставлено, связанные с доменом  $\alpha 3$ , наряду с тем будучи дополнительно связанными с или несвязанными с белком  $\beta 2$ -микроглобулина или его фрагментом.

Под термином "связанные" подразумевается близкое (нековалентное) взаимодействие между рассматриваемыми доменами или доменами и белками. Такое взаимодействие может достигаться путем образования водородных связей, или ван-дер-ваальсовых взаимодействий, или ионных связей.

Под свойством "специфического связывания" антитела изобретения или его антигенсвязывающих фрагментов подразумевается, что антитело или его антигенсвязывающие фрагменты непосредственно связываются с доменом  $\alpha 3$  белка HLA-G, исключая другие домены белка HLA-G или исключая связывание с другими человеческими белками, в частности, исключая связывание с другими белками HLA. Связывающая способность может быть измерена путем определения аффинности связывания в отношении домена  $\alpha 3$  белка HLA-G в соответствии с общепринятыми тестами, известными в области техники изобретения, в частности, аффинность связывания может быть оценена методом ELISA или вестерн-блот-анализом. Согласно отдельному варианту осуществления "специфическое связывание" означает, что взаимодействие между антителом или антигенсвязывающими фрагментами изобретения и доменом  $\alpha 3$  белка HLA-G посредством такого специфического связывания является более устойчивым, чем взаимодействие между антителом или антигенсвязывающими фрагментами изобретения и другими человеческими белками или другими доменами HLA-G или другими протеинами HLA. Устойчивость может быть оценена путем сравнения постоянства в течение продолжительного периода времени, или в условиях конкуренции, комплекса антиген-антитело и, в частности, путем измерения константы диссоциации антитела, распознающего домен  $\alpha 3$  белка HLA-G.

"Блокирующее антитело" представляет собой антитело, ингибирующее взаимодействие белков HLA-G с какими-либо или всеми из его рецепторов, например рецептором LILRB1 и/или рецептором LILRB2. Следовательно, "блокирование" в большинстве случаев означает, что биологическая функция после связывания между белками HLA-G с помощью домена  $\alpha 3$  и их рецепторов прекращается или сильно ослабляется в присутствии антитела или антигенсвязывающих фрагментов изобретения. Биологическая функция, о которой идет речь в этом контексте, является иммуно-ингибирующей активностью белков HLA-G, демонстрирующих домен  $\alpha 3$ , как раскрывается в описании и определяется в литературе. Соответственно можно констатировать, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются антагонистическими агентами белков HLA-G или антагонистическими агентами эффекта(ов) белков HLA-G, имеющих домен  $\alpha 3$ , вследствие препятствования активности таких белков HLA-G и/или противодействия их активности, по меньшей мере, отчасти или полностью, прямо или опосредованно. Предпочтительно уменьшение взаимодействия, т.е. связывания, с каким-либо или всеми рецепторами HLA-G составляет по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно 100%. Активность может быть измерена при помощи анализов связывания, известных в данной области техники.

Термины "нумерация Кабат", "определения по Кабат" и "обозначение по Кабат" используются взаимозаменяемым образом. Эти термины, известные в данной области техники, относятся к системе нумерации остатков аминокислот, которые являются более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в тяжелой и легкой цепях переменных участков антитела или их антигенсвязывающих частях (Kabat et al., 1971; Kabat, et al., 1991).

Использованный в описании термин "CDR" имеет отношение к определяющей комплементарности области в пределах переменных последовательностей антитела. Существует три CDR в каждом из переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи, которые обозначаются CDR1, CDR2 и CDR3 для каждого из переменных участков. Термин "CDR набор" при использовании в описании относится к группе

из трех CDR, которые входят в состав одного варибельного участка, способного к связыванию антигена. Точные границы этих CDR определяются по-разному в соответствии с разными системами. Система, описанная Кабат (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только предоставляет точную систему нумерации остатков, применимую к любому варибельному участку антитела, но также предоставляет точные границы остатков, определяющих три CDR. Эти CDR могут называться Kabat CDR. Chothia и сотрудники (Chothia et al., 1987; и Chothia et al., 1989) обнаружили, что некоторые субфрагменты в пределах CDR по Кабат принимают почти одинаковые конформации пептидных остовов, имея, несмотря на это, большое отличие на уровне аминокислотной последовательности.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела изобретения означает часть антитела, т.е. молекулу, соответствующую части структуры антитела изобретения, которая проявляет антигенсвязывающую способность в отношении домена  $\alpha 3$  белков HLA-G. В отдельном варианте осуществления указанный фрагмент демонстрирует в основном такую же антигенсвязывающую способность в отношении указанного домена, как антигенсвязывающая способность антитела, имеющего структуру полноразмерного антитела. Антигенсвязывающая способность может быть определена путем измерения аффинности антитела и рассматриваемого антигенсвязывающего фрагмента к целевому антигену.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела включают фрагменты, содержащие гиперварибельные домены, обозначенные CDR, или их часть(и), включая участок распознавания иммуногенного пептида. Каждая легкая и тяжелая цепи (соответственно VL и VH) четырехцепочечного иммуноглобулина имеет три CDR, обозначенные VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 и VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3 соответственно. Таким образом, изобретение имеет отношение к фрагментам антител изобретения (антигенсвязывающим фрагментам), которые содержат или состоят из вместе взятых или из выбранных вариантов CDR из числа VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 и VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 или их функциональных частей, т.е. частей, которые демонстрируют желательную связывающую способность, предпочтительно с высокой аффинностью, в отношении домена  $\alpha 3$  белков HLA-G.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, происходящему из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, но не к методу, с помощью которого оно получено. Таким образом, это не ограничивается только антителами, подучируемыми с помощью гибридомной технологии.

Термин "поликлональная сыворотка" подразумевает сыворотку, содержащую гетерогенную популяцию из множества различных антител или их фрагментов, индуцированных в отношении специфического антигена, которые поэтому являются специфичными к целому ряду различных антигенных детерминант, обнаруженных на указанном специфическом антигене.

Использованный в описании термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной с соответствующими последовательностями в антителе, полученном от конкретного вида, или принадлежащем к отдельному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(ей) является(ют)ся идентичной(ми) или гомологичной(ыми) с соответствующими последовательностями в антителах, происходящих от других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам такого антитела, при условии, что они демонстрируют желательную биологическую активность. При использовании в описании "гуманизованное антитело" является разновидностью "химерного антитела".

"Гуманизованные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную от нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело является человеческим иммуноглобулином (реципиентное антитело), в котором остатки из определяющего комплементарность участка (HVR) реципиента заменяются остатками из HVR вида, не принадлежащего к человеческому роду (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, который имеет желательную специфичность, аффинность и/или реакционную способность в отношении своих мишеней. В некоторых случаях остатки определяющих комплементарность участков человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими нечеловеческими остатками. Более того, гуманизованное антитело может содержать остатки, которые не найдены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть выполнены с целью дополнительного улучшения качества антитела, например, аффинности связывания. В общем гуманизованное антитело будет содержать практически все по меньшей мере один и, как правило, два варибельных домена, в которых все или большинство гиперварибельных петель соответствует таковой последовательности нечеловеческого иммуноглобулина, и все или большинство каркасных участков (FR) являются участками последовательности человеческого иммуноглобулина, несмотря на то что FR-участки могут включать одну или более одиночных замен в FR, которые улучшают характеристику антитела, такую как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.п. Количество этих аминокислотных замен в FR, как правило, составляет не более 6 в цепи H и не более 3 в цепи L. Гуманизованное антитело необязательно также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, констант-

ной области человеческого иммуноглобулина.

"Человеческое антитело" - это антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, выработанного человеком, и/или полученное с использованием какого-либо способа создания человеческих антител, известного в данной области техники, включая библиотеки фаговых дисплеев. Это определение человеческого антитела специфически исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей может быть определен с использованием алгоритма Karlin и Altschul, 1990, модифицированного как указано в Karlin и Altschul, 1993. Такой алгоритм является частью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0), Altschul, et al., 1990. Поиск белковых последовательностей BLAST может осуществляться с использованием программы XBLAST, счет=50, длина слова=3 для получения гомологии аминокислотных последовательностей с представляющими интерес белковыми молекулами. В тех случаях, когда существуют пропуски между двумя последовательностями, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., 1997. В случае использования программ BLAST и Gapped BLAST, могут использоваться стандартные параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

"Консервативные замены" будут давать в результате молекулы, имеющие функциональные и химические характеристики, сходные с характеристиками молекулы, из которой сделаны такие модификации. Например, "консервативная аминокислотная замена" может включать замену остатка аминокислоты другим остатком, такую, что будет наблюдаться небольшое влияние или будет отсутствовать влияние на полярность или заряд аминокислотного остатка в таком положении. Желательные аминокислотные замены (или консервативные или неконсервативные) могут быть установлены специалистом в данной области техники. Например, аминокислотные замены могут использоваться для установления важных остатков последовательности молекулы или для увеличения или уменьшения аффинности молекулы, описанной в документе. Варианты, содержащие одну или более консервативных аминокислотных замен, можно получить в соответствии с методами изменения последовательности полипептида, известными среднему специалисту в данной области техники, например, указанными в ссылках, которые собирают такие методы, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные аминокислотные замены включают замены, сделанные среди аминокислот в пределах следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в описании взаимозаменяемым образом и относятся к млекопитающему, подвергающемуся лечению, и/или лечению которого предполагается. Субъектом может быть человек, но также включаются другие млекопитающие, в частности млекопитающие, используемые в качестве лабораторных моделей болезней человека, например мышь, крыса, кролик, собака и т.д.

Термин "лечение" имеет отношение к действию, применению или терапии, при которой субъект, включая человека, подвергается медицинскому воздействию с целью улучшения состояния субъекта прямо или опосредованно. В частности, термин относится к уменьшению числа случаев или облегчению симптомов, исключению рецидивов, предотвращению рецидивов, предотвращению заболеваемости, улучшению симптомов, улучшению прогноза или их комбинации в некоторых вариантах осуществления. Квалифицированному специалисту понятно, что лечение не обязательно приведет к полному отсутствию или устранению симптомов. Например, что касается рака, "лечение" может иметь отношение к замедлению роста, пролиферации или метастазирования неопластических или злокачественных клеток, предотвращению или задержке осуществления роста, пролиферации или метастазирования неопластических или злокачественных клеток или некоторого сочетания из перечисленного выше.

Иммуногенный пептид.

Изобретатели сконструировали иммуногенный пептид с целью получения анти-HLA-G антител, специфических в отношении HLA-G с отсутствием перекрестной специфичности к классическим MHC молекулам I класса.

Аминокислотная последовательность HLA-G отличается от других молекул класса MHC I (HLA-E, A2, B7, B44 и CW3), как показано на фиг. 1A. Изменения в аминокислотах последовательностей класса MHC I по сравнению с последовательностью HLA-G выделены серым цветом, показывая множество критических точек в разных доменах. В частности, высоко специфическая последовательность для HLA-G была установлена в домене  $\alpha 3$  в положении 194-197. Эта часть HLA-G  $\alpha 3$  домена включает аминокислоты, необходимые для взаимодействия между HLA-G и его рецепторами (фиг. 1A).

На основании этого изобретатели создали иммуногенный пептид, состоящий из последовательности X1-TNHPVFDYEATLR-X2 (SEQ ID NO: 49), где X1 отсутствует или является цистеином, валином или является последовательностью, выбранной из группы, состоящей из KTHV (SEQ ID NO: 50) или SKTHV (SEQ ID NO: 51), и X2 отсутствует или является цистеином.

В предпочтительном варианте осуществления пептид является циклическим и состоит из последовательности



- a) СТННРВFDYEATLRC (SEQ ID NO: 52);  
 b) СКТННРВFDYEATLRC (SEQ ID NO: 53),

где дисульфидная связь связывает N-концевой и C-концевой остатки цистеина.

В другом предпочтительном варианте осуществления пептид является линейным и состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из

- ТННРВFDYEATLR (SEQ ID NO: 54);  
 ТННРВFDYEATLRC (SEQ ID NO: 55);  
 VTННРВFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56);  
 VTННРВFDYEATLR (SEQ ID NO: 57);  
 СТННРВFDYEATLR (SEQ ID NO: 58);  
 КТННРВFDYEATLR (SEQ ID NO: 59);  
 КТННРВFDYEATLRC (SEQ ID NO: 60); и  
 СКТННРВFDYEATLR (SEQ ID NO: 61).

Пептид может быть получен с помощью любого метода, известного в данной области техники, например, химического синтеза или путем рекомбинации.

Также предоставляется нуклеиновая кислота, кодирующая указанный пептид.

Изобретение также имеет отношение к вектору для клонирования и/или для экспрессии нуклеиновой кислоты, в частности плазмиде, подходящей для клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Согласно отдельному варианту осуществления могут быть добавлены регуляторные последовательности для транскрипции и экспрессии.

Рекомбинантные векторы экспрессии в большинстве случаев содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность, предназначенную для экспрессии, функционально связанную с промотором, или конститутивным или индуцибельным. Векторы могут применяться для репликации и интеграции в прокариоты, эукариоты или и то, и другое. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации, и промоторы, подходящие для регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный иммуногенный пептид. Векторы необязательно содержат типичные экспрессионные кассеты, включающие по меньшей мере одну независимую терминирующую последовательность, последовательности, разрешающие репликацию кассеты и у эукариот и у прокариот, т.е. челночные векторы, и селективные маркеры, как для прокариотической, так и эукариотической систем.

Как подробно описывается далее, иммуногенный пептид пригоден для выработки анти-HLA-G антител путем иммунизации.

Анти-HLA G-антитела.

Настоящее изобретение имеет отношение к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с иммуногенным пептидом, описанным выше.

Все анти-HLA-G антитела изобретения распознают домен  $\alpha 3$  белков HLA-G.

В отдельном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с доменом  $\alpha 3$  белков HLA-G, имеющих конформацию, обнаруженную в естественных условиях в клетках, экспрессирующих HLA-G. Другими словами, такое антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент распознает специфический эпитоп домена  $\alpha 3$  HLA-G, установленный в естественных условиях в клетках, экспрессирующих HLA-G.

Целью изобретения является получение специфических анти-HLA-G антител к изоформам HLA-G, включающим домен  $\alpha 3$ , или распознающих изоформы HLA-G, связанные с доменом  $\alpha 3$ . Соответственно, когда речь идет о связывании с белком HLA-G, изобретение главным образом имеет отношение к связыванию с изоформой HLA-G, которая обладает доменом  $\alpha 3$ .

В отдельном варианте осуществления предоставляются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают растворимые формы HLA-G.

В другом варианте осуществления предоставляются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают "мембрано-заякоренные" формы HLA-G.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления антитела настоящего изобретения распознают иммуногенный пептид, или в линейной форме или в циклической форме, а также белок HLA-G в растворимой форме и белок HLA-G на клеточной поверхности (т.е. в нативной конформации).

Как указано выше, белок HLA-G может встречаться в нескольких структурных (или трехмерных) формах, которые обычно называются изоформами. HLA-G1 и HLA-G5 являются, соответственно, мембрано-связанными или секретируемыми белками HLA-G, которые встречаются как связанные или несвязанные с  $\beta 2$ -микроглобулином. В противоположность этому, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4 являются мембрано-связанными изоформами белка HLA-G, не демонстрирующими одновременно все домены  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ . Изоформа HLA-G1 также может встречаться в виде димерной формы на клеточной поверхности. HLA-G6 и HLA-G7 являются секретируемыми изоформами белка HLA-G, также не демонстрирующими одновременно все домены  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ .

Предпочтительно анти-HLA-G антитела изобретения распознают все изоформы HLA-G, демонст-

рирующие домен  $\alpha 3$ .

В предпочтительном варианте осуществления антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одной или несколькими изоформами белка HLA-G, выбранными из числа HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6 (мономерные и димерные изоформы).

В конкретном варианте осуществления анти-HLA-G антитела изобретения распознают белки HLA-G независимо от того, связываются ли они с белком  $\beta 2$ -микроглобулином или нет.

Белок  $\beta 2$ -микроглобулин, который в некоторых случаях может встречаться связанным с белком HLA-G, тем не менее, не систематически присутствует во всех изоформах белка HLA-G. Как подробно описано выше, присутствие связанного белка  $\beta 2$ -микроглобулина также не является необходимым для обеспечения возможности связывания белка HLA-G с ингибиторным рецептором LILRB2.

Таким образом, в контексте изобретения " $\beta 2$ -микроглобулин-свободный белок HLA-G" имеет отношение к белку HLA-G, не связанному с  $\beta 2$ -микроглобулином. Под " $\beta 2$ -микроглобулин-свободной укороченной изоформой белка HLA-G" или " $\beta 2$ -микроглобулин-свободной укороченной изоформой белка HLA-G, имеющей домен  $\alpha 3$ " подразумевается белок HLA-G, не имеющий все домены, которые можно обнаружить в белке HLA-G, и не связанный с  $\beta 2$ -микроглобулином.

В отдельном варианте осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с доменом  $\alpha 3$ , когда он присутствует в HLA-G, в частности в  $\beta 2$ -микроглобулин-свободном HLA-G, т.е.  $\beta 2$ -микроглобулин-свободном HLA-G, имеющем домен  $\alpha 3$ , или  $\beta 2$ -микроглобулин-свободном укороченном HLA-G, имеющем домен  $\alpha 3$ .

В отдельном варианте осуществления предоставляются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с доменом  $\alpha 3$  белка HLA-G, когда этот белок имеет форму мономера или димера.

Согласно конкретному варианту осуществления антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом  $\alpha 3$  белка HLA-G, когда указанный белок представляет собой мономерную и/или димерную форму, и связывается с доменом  $\alpha 3$ , в том случае, когда он имеется в белке HLA-G, не зависимо от того, связывается ли он или не связывается с  $\beta 2$ -микроглобулином.

С целью иллюстрации специфических вариантов осуществления изобретения, антигенсвязывающие фрагменты антитела, содержащие переменные домены, включающие CDR указанного антитела, включают Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, которые хорошо определяются на основании Кабат и также Roitt I. et al. (Fundamental и Applied Immunology MED Si/McGraw-Hill). Fv фрагменты состоят из VL и VH доменов антитела, соединенных вместе при помощи гидрофобных взаимодействий; в dsFv фрагментах VH:VL гетеродимер стабилизируется дисульфидной связью; в scFv фрагментах VL и VH домены соединяются друг с другом посредством гибкого пептидного линкера, тем самым образуя одноцепочечный белок. Fab-фрагменты являются мономерными фрагментами, которые получают при расщеплении папаином антитела; они содержат целую цепь L и фрагмент VH-CN1 цепи H, связанный посредством дисульфидной связи. F(ab')<sub>2</sub> фрагмент можно получить путем расщепления папаином антитела антитела ниже шарнирной области дисульфидной связи; он содержит два Fab' фрагмента и дополнительно участок шарнирной области молекулы иммуноглобулина. Фрагменты Fab' можно получить из фрагментов F(ab')<sub>2</sub> путем разрезания дисульфидной связи в шарнирной области. Фрагменты F(ab')<sub>2</sub> являются двухвалентными, т.е. они содержат два антигенсвязывающих участка, подобно природной молекуле иммуноглобулина; с одной стороны, фрагменты Fv (VH-VL димер, формирующий переменную часть Fab), dsFv, scFv, Fab и Fab' являются одновалентными, т.е. они содержат один антигенсвязывающий участок.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления предоставляются scFv фрагменты.

Фрагменты, содержащие или состоящие из VH-CDR3 и/или VL-CDR3 или их функциональных участков, являются особенно предпочтительными, когда CDR3 участки оказываются обуславливающими специфичность распознавания антигена. Отдельные антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1, CDR2 и CDR3 домены VH и/или VL антитела.

Эти антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут быть объединены вместе для получения поливалентных антигенсвязывающих фрагментов, таких как диатела, триотела, тетратела. Эти поливалентные антигенсвязывающие фрагменты также являются частью настоящего изобретения.

Также рассматриваются биспецифические или мультиспецифические антитела, способные к одновременному связыванию двух различных эпитопов на одном и том же или разных антигенах. Биспецифические или мультиспецифические антитела можно получить с помощью разных биохимических способов, например, путем химической конъюгации двух антител, слиянием клеточных линий, продуцирующих два антитела, или с помощью генетических подходов, дающих в результате рекомбинантные биспецифические или мультиспецифические молекулы антител.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитела изобретения являются моноклональными антителами. Следовательно, изобретение также имеет отношение к моноклональным антителам, что означает, что композиция из этих антител содержит антитела, являющиеся идентичными, если иметь в виду антигенсвязывающую специфичность и, соответственно, в плане структуры переменного участка.

В следующем варианте осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты

предоставляются в виде поликлональной сыворотки или выделяются из поликлональной сыворотки.

Согласно изобретению антитело может быть антителом млекопитающего, не являющегося человеком, например мышинным антителом или химерным антителом. В предпочтительном варианте осуществления антитело может быть гуманизированным. В отдельном варианте осуществления рассматриваются человеческие антитела.

В другом варианте осуществления изобретение также имеет отношение к конструкции, содержащей антитело согласно любому предоставленному в описании определению или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с функционально разными молекулами.

Конструкция изобретения может быть или гибридным белком или конъюгатом, являющимся результатом любого подходящего вида присоединения, включая ковалентное присоединение, привитие, химическое связывание с химической или биологической группой или молекулой, такой как защитная группа или молекула, подходящая для защиты от расщепления протеазами *in vivo*, для улучшения стабильности и/или времени полужизни антитела или антигенсвязывающего фрагмента, с биологически активной молекулой, в частности терапевтически активным ингредиентом, например токсином или цитотоксическим средством, вектором (включая в частности белковый вектор), подходящим для нацеливания антитела или антигенсвязывающего фрагмента на конкретные клетки или ткани тела человека, или с меткой, например радиоэлементом, или с линкером, в частности, когда используются фрагменты антитела.

Примеры предпочтительных антител или их антигенсвязывающих фрагментов описаны далее.

В отдельном варианте осуществления предоставляется анти-HLA-G антитело, содержащее

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 8, и/или определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 10, и/или определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 12; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 2, и/или определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и/или определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) SEQ ID NO: 5.

Предпочтительно такое антитело содержит

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 10 и определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 12; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 2, определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) SEQ ID NO: 5.

При этом предпочтительно такое антитело может содержать

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит SEQ ID NO: 64 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 64; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит SEQ ID NO: 63 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 63.

В отдельном варианте осуществления гомологичная последовательность отличается только конститутивными заменами аминокислот.

В другом варианте осуществления гомологичная последовательность является гуманизированной последовательностью.

В отдельном аспекте антитело является полноразмерным иммуноглобулином G, который содержит две тяжелых цепи, включая вариабельный участок (VH), содержащий SEQ ID NO: 64; и

две легких цепи, включая вариабельный участок (VL), содержащий SEQ ID NO: 63.

Такое антитело называется 15E7 и более подробно описывается в экспериментальном разделе.

В другом конкретном варианте осуществления предоставляется антитело, содержащее

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 23, и/или определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 25 и/или определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 27; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 15, и/или определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS, и/или определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) SEQ ID NO: 18.

Предпочтительно такое антитело содержит

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 23, определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 25 и определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 27; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 15, определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) of SEQ ID NO: 18.

При этом предпочтительно такое антитело может содержать

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит SEQ ID NO: 67 или гомологичную последовательность, показывающую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 67; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит SEQ ID NO: 65 или гомологичную последовательность, показывающую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 65.

В отдельном варианте осуществления гомологичная последовательность отличается только конститутивными заменами аминокислот.

В другом варианте осуществления гомологичная последовательность является гуманизированной последовательностью.

В предпочтительном аспекте оно является scFv, который содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH), включающий SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи (VL), включающий SEQ ID NO: 65. Такой scFv фрагмент называется R4C-C3 и более подробно описывается в экспериментальном разделе.

В другом отдельном варианте осуществления предоставляется антитело, которое содержит

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 23, и/или определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 25 и/или определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 27; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 15, и/или определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и/или определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) SEQ ID NO: 20.

Предпочтительно такое антитело содержит

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 23, определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 25 и определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 27; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 15, определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) of SEQ ID NO: 20.

При этом предпочтительно такое антитело может содержать

(a) вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который содержит SEQ ID NO: 67 или гомологичную последовательность, показывающую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 67; и/или

(b) вариабельный участок легкой цепи (VL), который содержит SEQ ID NO: 66 или гомологичную последовательность, показывающую более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, еще более предпочтительно более чем 95% идентичность с SEQ ID NO: 66.

В отдельном варианте осуществления гомологичная последовательность отличается только конститутивными заменами аминокислот.

В другом варианте осуществления гомологичная последовательность является гуманизированной последовательностью.

В другом аспекте предоставляется scFv, который содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий SEQ ID NO: 67, и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий SEQ ID NO: 66. Такой scFv фрагмент называется R5C-D8.

Последовательности вариабельных участков антитела перечислены в перечне последовательностей и представлены ниже.

VL к цепь антитела 15E7:

FR1: DVLMTQIPFSLPVSLGDAQASISCRSS (SEQ ID NO: 1);

CDR1: QSIVHRSGNTY (SEQ ID NO: 2);

FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3);

CDR2: KVS;

FR3: NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 4);  
 CDR3: FQGSHLPPT (SEQ ID NO: 5) FR4: FGGTTLEIK (SEQ ID NO: 6).

VH цепь антитела 15E7:

FR1: QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKAS (SEQ ID NO: 7);  
 CDR1: GYTFTDYW (SEQ ID NO: 8);  
 FR2: MDWVKQRPGQGLEWIGT (SEQ ID NO: 9);  
 CDR2: IYPSDSST (SEQ ID NO: 10);  
 FR3: HYNQEFK GKATMTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 11);  
 CDR3: AREGLAGVFYFDY (SEQ ID NO: 12);  
 FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13).

VL к цепь scFv R4C-C3:

FR1: DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14);  
 CDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 15);  
 FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 16);  
 CDR2: KVS;  
 FR3: NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 17);  
 CDR3: SQSTHFPT (SEQ ID NO: 18);  
 FR4: FGGGTKLEII (SEQ ID NO: 19).

VL к цепь scFv R5C-D8:

FR1: DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14);  
 CDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 15);  
 FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 16);  
 CDR2: KVS;  
 FR3: NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 17);  
 CDR3: SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 20);  
 FR4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 21).

VH цепь scFv R4C-C3 & R5C-D8:

FR1: QVQLKQSGPQLVRPGASVKIPCKAS (SEQ ID NO: 22);  
 CDR1: GYSFTNYW (SEQ ID NO: 23);  
 FR2: MHWVKQRPGQGLEWIGM (SEQ ID NO: 24);  
 CDR2: IAPSDSDS (SEQ ID NO: 25);  
 FR3: RLNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 26);  
 CDR3: AREGVTMITTGLDY (SEQ ID NO: 27);  
 FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 28).

Были получены дополнительные антитела (названные N27F12 и N38F4) и scFv (названные 3157-C57-R6B-C10, 3157-C57-R6B-G3 и 3157-C57-R6B-H10). Последовательности переменных участков указанных дополнительных антител и scFv перечислены в перечне последовательностей и описываются, как указано ниже.

VL цепь к антитела N27F12:

FR1: ENVLTQSPAIMAASLGKVTMTCSAS (SEQ ID NO: 68);  
 CDR1: SSVSSNF (SEQ ID NO: 69);  
 FR2: LHWYQQKSGTSPKLWIY (SEQ ID NO: 70);  
 CDR2: GTS;  
 FR3: NLAGVPARFSGSGTGISYSLTVSHMEAENDAAYYC (SEQ ID NO: 71);  
 CDR3: QQWNAYPFT (SEQ ID NO: 72);  
 FR4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 21).

VH цепь антитела N27F12:

FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS CVAS (SEQ ID NO: 73);  
 CDR1: GFTFSSYW (SEQ ID NO: 74);  
 FR2: LSWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO: 75);  
 CDR2: VRLKSDNYAT (SEQ ID NO: 76);  
 FR3: SYAESVKGKFTISRDDANSRLYLQMNSLRPEDTGIYYC (SEQ ID NO: 77);  
 CDR3: TTGDY (SEQ ID NO: 78);  
 FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13).

VL цепь к антитела N38F4:

FR1: DVVMTQIPLSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 79);  
 CDR1: QSLVNSNGNTL (SEQ ID NO: 80);  
 FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 16);  
 CDR2: KVS;  
 FR3: NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 17);  
 CDR3: SQSTHVPWT (SEQ ID NO: 81);

FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82).  
 VH цепь антитела N38F4:  
 FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS (SEQ ID NO: 73);  
 CDR1: GLTFSSYW (SEQ ID NO: 83);  
 FR2: MSWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO: 84);  
 CDR2: IRLRSDNYVK (SEQ ID NO: 85);  
 FR3: QYADSVKGRFTISRDDSKGRLYLQMNRLRGDDTGIYFC (SEQ ID NO: 86);  
 CDR3: TTGDY (SEQ ID NO: 78);  
 FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13);  
 VL цепь к scFv 3157-C57-R6B-C10 и 3157-C57-R6B-G3:  
 FR1: DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14);  
 CDR1: QTIVHNSNGNTY (SEQ ID NO: 87);  
 FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3);  
 CDR2: KVS;  
 FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 4);  
 CDR3: FQGSHVPPPT (SEQ ID NO: 88);  
 FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82);  
 VH цепь scFv 3157-C57-R6B-C10:  
 FR1: EVQLQQSGAELVKPGT SVKL SCKAS (SEQ ID NO: 89);  
 CDR1: GYTFTRNW (SEQ ID NO: 90);  
 FR2: ITWVRLRPGQGLEWIGD (SEQ ID NO: 91);  
 CDR2: IYPGDAST (SEQ ID NO: 92);  
 FR3: HYNQKFKNKATLTVDTSSSTAYLQVSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 93);  
 CDR3: AREQVQFAMFFDV (SEQ ID NO: 94);  
 FR4: WGTGATVTVSS (SEQ ID NO: 95).  
 VH цепь scFv 3157-C57-R6B-G3:  
 FR1: QVQLQQPRAELVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 96);  
 CDR1: GYTFARYW (SEQ ID NO: 97);  
 FR2: ISWLKLRPGQGLEWIGD (SEQ ID NO: 98);  
 CDR2: IYPGDDST (SEQ ID NO: 99);  
 FR3: HYNQKFKNKATLTVDTSTSTAYIQLSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 100);  
 CDR3: AREQVQFAMFFDV (SEQ ID NO: 94) FR4: WGTGATVTVSS (SEQ ID NO: 95).  
 VL цепь к scFv 3157-C57-R6B-H10:  
 FR1: DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14);  
 CDR1: QSIVHNSNGNTY (SEQ ID NO: 101);  
 FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3);  
 CDR2: KVS;  
 FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 4);  
 CDR3: FQGSHVPPPT (SEQ ID NO: 88);  
 FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82).  
 VH цепь scFv 3157-C57-R6B-H10:  
 FR1: QVQLQQPGAELV R P G S S V K L S C K A S (SEQ ID NO: 7);  
 CDR1: GYTF TDY W (SEQ ID NO: 8);  
 FR2: MDWVKQRPGQGLEWIGT (SEQ ID NO: 9);  
 CDR2: IYPSDSST (SEQ ID NO: 10);  
 FR3: HYNQEFK GKATMTVDKSSSTAYMHLGSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 102);  
 CDR3: AREGLAGVFYFDY (SEQ ID NO: 12);  
 FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13).

Настоящее раскрытие также предоставляет варианты вышеупомянутых предпочтительных антител с улучшенными биологическими свойствами антитела, такими как более высокая аффинность связывания. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения подходящих нуклеотидных замен в нуклеиновую кислоту антитела или посредством синтеза пептидов. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в пределах аминокислотной последовательности антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены осуществляется с целью получения окончательной конструкции при условии, что окончательная конструкция обладает желательными характеристиками. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, могут быть получены с помощью целого ряда методов, известных в данной области техники. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, олигонуклеотидопосредованный (или сайт-направленный) мутагенез, PCR мутагенез и кассетный мутагенез ранее полученного варианта или невариантной (природной) версии антитела. В одном варианте осуществления значение равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) антитела изобретения составляет менее чем  $10^{-8}$  М, в

частности менее чем  $10^{-9}$  или  $10^{-10}$  М. Аффинность связывания можно определить при помощи методов, известных в данной области техники, таких как ELISA или анализ биоспецифичного взаимодействия, или других методов, известных в данной области техники.

Любые из описанных в этом документе антител можно изучить с целью установления их свойств, таких как антигенсвязывающая активность, антигенсвязывающая специфичность и биологические функции, пользуясь традиционными методами.

Любые из описанных в этом документе антител могут быть модифицированы с целью включения дополнительных небелковоподобных фрагментов, которые известны в данной области техники и легко доступны, например, путем пегилирования, гликозилирования и т.п. Представляют интерес модификации, которые могут увеличить время полужизни в сыворотке.

Получение анти-НLA-G-антител путем иммунизации.

В одном аспекте изобретения иммуногенный пептид, описанный выше, может использоваться в качестве иммуногена для получения антител, специфических к домену  $\alpha 3$  белка НLA-G.

Для иллюстрации антитела изобретения или их фрагменты, таким образом, могут быть получены посредством иммунизации млекопитающего, например грызуна, в частности мышей и крыс, при помощи иммуногенного пептида, описанного выше. Можно сделать вывод, что для реализации настоящего изобретения путем иммунизации млекопитающего подходят различные генотипы млекопитающих.

Протоколы иммунизации могут включать стадии примирования и стимулирования, как более подробно описано далее.

Таким образом, изобретение имеет отношение к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, который включает

- a) введение животному, не являющемуся человеком, иммуногенного пептида, описанного выше;
- b) восстановление из образцов сыворотки или плазмы, полученных от животных, индуцированных антител и проверку их специфичности в отношении домена  $\alpha 3$  белка НLA-G;
- c) необязательно клонирование восстановленных антител; и
- d) необязательно приготовление антигенсвязывающих фрагментов из восстановленных антител.

Введение, восстановление индуцированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и последующее клонирование может осуществляться с помощью традиционных в данной области техники методов. Методы получения характеристик до клонирования с использованием, например, усовершенствованных методов секвенирования хорошо известны в данной области техники.

Приготовление антигенсвязывающих фрагментов из восстановленных антител также может осуществляться с помощью традиционных методов в данной области техники, в частности, с помощью технологий с высокой пропускной способностью.

Животными-хозяевами для продуцирования антител или антигенсвязывающих фрагментов могут быть млекопитающие за исключением человека, особенно кролики, в частности мыши.

Согласно отдельному варианту осуществления раскрытый в этом документе способ продуцирования также включает стадию умерщвления животных-хозяев, использованных для получения антител изобретения.

Согласно отдельному варианту осуществления способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению включает совместное введение на стадии a) адьюванта, последний определяется как какой-либо ингредиент, в частности соединение, которое действует, чтобы способствовать, ускорить, продлить или увеличить антиген-специфические иммунные ответы при использовании в комбинации с введенным антигеном(ами) или иммуногенным фрагментом(ами) антигена. Адьюванты хорошо известны в области иммунизации (или вакцинации) и иммунотерапии.

Согласно отдельному варианту осуществления введение согласно стадии a. раскрытого выше метода осуществляется с использованием протокола иммунизации примирование/стимулирование, включающего первое введение (примирующую иммунизацию или примирующее введение) активных иммуногенных средств и затем по меньшей мере одно дополнительное введение (стимулирующая иммунизация или стимулирующее введение), которое отделено по времени от первого введения в течение курса протокола иммунизации. Стимулирующие иммунизации включают одно, два, три или более введений.

В отдельном варианте осуществления использованный протокол иммунизации примирование/стимулирование является протоколом гомологичной иммунизации или гетерологичной иммунизации, что означает, что введенные активные, иммуногенные, ингредиенты (например, антитела или фрагменты) соответственно являются одинаковыми при примирующем и стимулирующем введениях или разными.

В отдельном варианте осуществления введение активных иммуногенных ингредиентов на стадии a. упомянутого выше метода, включая случаи, когда проводится примирующее введение и/или когда проводится стимулирующая иммунизация, осуществляется одновременно с адьювантом, например, адьювантом Фрейнда. Адьювантами являются вещества, хорошо известные в данной области техники.

В отдельном варианте осуществления введение адьюванта проводится как при примирующей, так и при стимулирующей иммунизациях, в частности, в том случае, когда для иммунизации используются

полипептиды или их иммуногенные фрагменты.

Подробности протокола иммунизации, который может использоваться "как есть" или может служить основой для разработки протокола иммунизации, предназначенного для продуцирования антитела или его антигенсвязывающих фрагментов с использованием иммунизации, приводятся в разделе "Примеры" ниже.

В другом варианте осуществления млекопитающее иммунизируют с помощью нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего указанный иммуногенный пептид, например, посредством ДНК-иммунизации.

Некоторые способы доставки для ДНК-иммунизации являются наиболее распространенными, такие как внутримышечная или внутрикожная инъекция нуклеиновой кислоты или вектора в физиологическом растворе, при этом ДНК доставляется во внеклеточное пространство. Этот метод может осуществляться путем "электропорации", при которой используется электростимуляция биологических тканей для получения временно пермеабилзированной мембраны клетки(ок). Альтернативно может использоваться "доставка с помощью генной пушки", которая включает "бомбардировку" кожи частицами золота, покрытыми плазмидами, путем использования баллистических устройств, обеспечивающих доставку ДНК непосредственно в цитоплазму клетки(ок). Альтернативно может использоваться "безыгольное устройство для инъекций", которое основано на применении принудительного "вдавливания" плазмидной ДНК в клетки в эпидермисе и дерме.

Для получения поликлональных антител получают сыворотку от иммунизированного животного, не являющегося человеком, и присутствующие в ней антитела выделяют с помощью хорошо известных методов. Сыворотку можно аффинно очистить с помощью упомянутого выше иммуногенного пептида, соединенного с твердой подложкой, для того, чтобы получить анти-HLA-G антитела.

В альтернативном варианте осуществления выделяют лимфоциты неиммунизированного животного, не являющегося человеком, выращенные *in vitro*, которые затем подвергают воздействию иммуногена в клеточной культуре. Затем лимфоциты собирают и проводят стадию слияния, описанную ниже.

Для моноклональных антител следующей стадией является выделение спленоцитов из иммунизированного животного, не являющегося человеком, и последующее слияние этих спленоцитов с иммортализованными клетками с целью формирования гибридомы, продуцирующей антитела, как описано в Naglow et al., 1988; Hammerling et al., 1981.

Альтернативно моноклональные антитела изобретения или их фрагменты можно получить с помощью любых других известных методов, включая использование рекомбинантных технологий, методов фагового дисплея или их комбинации.

Рекомбинантная выработка моноклональных антител или их фрагментов включает экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты в подходящих клетках-хозяевах, как описано ниже.

Рекомбинантное получение анти-HLA-G-антител.

Изобретение также имеет отношение к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент, как раскрывается в описании.

В частности, предоставляется нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный участок тяжелой цепи (VH), переменный участок легкой цепи (VL) или оба участка анти-HLA-G-антитела, описанного выше.

Нуклеотидные последовательности CDR, описанные в этом документе, могут быть легко спроектированы или получены секвенированием.

Для иллюстрации нуклеотидные последовательности переменных участков легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела 15E7 представляют собой SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 38, показанные на фиг. 2A и 3A соответственно.

Нуклеотидная последовательность переменного участка легкой цепи scFv R4C-C3 представляет собой SEQ ID NO: 41, показанную на фиг. 4A, тогда как R4C-C3 нуклеотидная последовательность тяжелой цепи, а именно SEQ ID NO: 46, показана на фиг. 5A.

Далее описывается способ получения рекомбинантных антител или их фрагментов.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела изобретения, "вставляют" в векторы экспрессии. Легкая и тяжелая цепи могут быть клонированы в один и тот же или разные векторы экспрессии. Сегменты ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулина, функционально связаны с регуляторными последовательностями в векторе(ах) экспрессии, который(ые) обеспечивает(ют) экспрессию полипептидов иммуноглобулинов. Такие регуляторные последовательности включают сигнальную последовательность, промотор, энхансер и последовательность терминации транскрипции. Векторы экспрессии в большинстве случаев реплицируются в организмах-хозяевах или как эписомы, или как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Как правило, векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например тетрациклин или неомицин, для обеспечения возможности обнаружения клеток, трансформированных представляющими интерес последовательностями ДНК.

В одном примере обе последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, включают в один вектор экспрессии. В другом примере каждую из легких и тяжелых цепей антитела клонируют в отдельный вектор. В последнем случае векторы экспрессии, кодирующие легкую и тяжелую цепи, могут быть



котрансфицированы в одну клетку-хозяина с целью экспрессии обеих цепей, которые могут быть объединены для формирования интактного антитела или *in vivo* или *in vitro*. Альтернативно вектор экспрессии, кодирующий тяжелую цепь и кодирующий легкую цепь, может быть введен в различные клетки-хозяева для экспрессии каждой из тяжелых и легких цепей, которые затем могут быть очищены и "собраны" с целью формирования интактного антитела *in vitro*.

Антитела, описанные в этом документе, или их фрагменты могут продуцироваться в прокариотической или эукариотической системах экспрессии, таких как бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы, клетки насекомых и млекопитающих. Рекомбинантные антитела необязательно должны быть гликозилированными или экспрессироваться в эукариотических клетках; тем не менее экспрессия в клетках млекопитающих в основном является предпочтительной. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются эмбриональные клетки почки человека (293 клетки), клетки почки новорожденного хомяка (ВНК клетки), клетки яичника китайского хомяка/- или + DHFR (CHO, CHO-S, CHO-DG44, клетки Flp-in CHO), клетки почки африканской зеленой марышки (VERO клетки) и клетки печени человека (Нер G2 клетки).

Культура клеток тканей млекопитающих является предпочтительной для экспрессии и продуцирования полипептидов в связи с тем, что целый ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, был создан в данной области техники и включает клеточные линии CHO, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, предпочтительно линии миеломных клеток или трансформированные В-клетки или гибридомы.

Векторы экспрессии для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер, и необходимые участки обработки информации, такие как участки связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и терминирующие транскрипцию последовательности. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из генов иммуноглобулинов, SV40, аденовируса, папилломавируса крупного рогатого скота, цитомегаловируса и т.п.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, и последовательности контроля экспрессии) могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые варьируют в зависимости от типа клеток хозяина. Например, для разных клеточных хозяев может использоваться обработка фосфатом кальция или электропорация (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989). Когда тяжелая и легкая цепи клонируются в отдельные векторы экспрессии, векторы котрансфицируются для получения экспрессии и сборки интактных иммуноглобулинов.

Клетки-хозяева трансформируются или трансфицируются векторами (например, с помощью методов химической трансфекции или электропорации) и культивируются в обычных питательных средах (или модифицированных, в зависимости от ситуации) для индуцирования промоторов, отбора трансформированных клеток или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности.

После экспрессии антитела настоящего изобретения или их фрагменты могут быть выделены или очищены с целью получения практически однородных препаратов для дальнейших исследований и применения. Можно использовать стандартные методы очистки белков, известные в данной области техники. Например, подходящие методы очистки могут включать фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), фракционирование сульфатом аммония и гель-фильтрацию (смотри Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982). Для фармацевтического использования предпочтительными являются практически чистые иммуноглобулины с однородностью по меньшей мере примерно от 90 до 95% и наиболее предпочтительно с однородностью от 98 до 99%.

Методы фагового дисплея.

Антитела с желательными характеристиками связывания также могут быть получены при помощи библиотек фагового дисплея и скрининга.

В некоторых методах фагового дисплея наборы генов VH и VL клонируют отдельно с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем могут подвергаться скринингу в отношении антигенсвязывающего фага, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). В большинстве случаев фаги демонстрируют фрагменты антител, или в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv) или фрагментов Fab. Библиотеки из иммунизированных источников предоставляют высокоаффинные антитела к иммуногену, не требуя создания гибридом. Альтернативно интактный набор может быть клонирован (например, от человека), чтобы обеспечить один источник антител к широкому спектру "чужих" и также собственных антигенов без иммунизации. Наконец, интактные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования не-реаранжированных V-генных сегментов из стволовых клеток и использования PCR праймеров, содержащих случайную последовательность, чтобы кодировать высоко варьируемые CDR3 участки и совершить реаранжировку *in vitro*.

Применение в терапевтических целях.

Анти-HLA-G антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела или фрагменты, или векторы, экспрессирующие то же самое, находят применение при лечении патологий, таких как рак или канцерогенные болезни, а также родственных или связанных болезней или состояний, когда эти патологии связаны с механизмом ускользания опухолей, затрагивающим HLA-G. Конкретнее, анти-HLA-G антитела или их антигенсвязывающие фрагменты пригодны для использования при лечении патологий, вовлекающих ненадлежащую экспрессию белков HLA-G у хозяина.

Конкретнее, в документе описывается способ лечения рака или вирусной инфекции, при этом данный способ включает введение композиции, содержащей анти-HLA-G антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела или фрагменты, или векторы, экспрессирующие их же, нуждающемуся в этом пациенту.

Анти-HLA-G антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться как отдельный активный ингредиент или в сочетании с другим методом лечения, таким как химиотерапевтическое лечение, радиотерапевтическое лечение или другое иммунотерапевтическое лечение, включая терапевтическую вакцинацию.

Анти-HLA-G-антитела, описанные в данном документе, отдельно или в комбинации с другими видами терапии, пригодны для противодействия механизмам иммунного избегания, связанным с HLA-G, и способствуют общему противоопухолевому действию и приносят пользу раковым пациентам.

В конкретном варианте осуществления антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть блокирующими антителами. Под "блокирующими антителами" или "нейтрализующими антителами" понимают антитела, которые ингибируют HLA-G связывание, по меньшей мере, с лейкоцитарным иммуноглобулин-подобным рецептором B1 (LILRB1/ILT2/CD85j) или LILRB2 (ILT4/CD85d).

Согласно отдельному варианту осуществления предотвращается связывание по меньшей мере между одной или несколькими из следующих изоформ белка HLA-G: HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 или HLA-G6 и их рецепторами, распознаваемыми доменом  $\alpha 3$ .

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание белка HLA-G, имеющего домен  $\alpha 3$  по меньшей мере с одним из LILRB1 или LILRB2 рецепторов, в частности, блокирует связывание указанного белка HLA-G с обоими LILRB1 и LILRB2 рецепторами.

В другом варианте осуществления антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с цитотоксическим агентом. В некоторых аспектах такая конструкция (также называемая конъюгатом антитело-лекарственное средство или ADC) дополнительно содержит по меньшей мере один спейсер или линкер, который может быть пептидным линкером или непептидным линкером. Такие линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Специалистам известно несколько способов связывания антитела с цитотоксическими агентами. ADC в большинстве случаев получают путем конъюгации цитотоксического агента с антителом за счет использования боковых цепей или поверхностно-расположенных лизинов или свободных цистеинов, образуемой посредством восстановления межцепочечных дисульфидных связей.

Цитотоксическое средство или цитотоксин может быть любой молекулой, известной в данной области техники, которая ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток (клеточную смерть), и/или оказывает антинеопластические /антипролиферативные воздействия. Известно, что ряд классов цитотоксических средств потенциально может быть полезен в молекулах ADC. Сюда включаются, но без ограничения, аманитины, ауристатины, дауномицины, доксорубицины, даунокармицины, доластатины, эндины, лекситропсины, таксаны, пуромицины, майтанзиноиды, винка алкалоиды, тубулизины и пирролодензодиазепины. В качестве цитотоксического агента могут использоваться токсины, включая растительные токсины и бактериальные токсины, например, столбнячный и дифтерийный токсины, ригин, сапонин, эндотоксин A и т.д.

В отдельном варианте осуществления антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с радионуклидом.

В следующем варианте осуществления антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть сконструированными (например, модифицированными или химеризованными) так, что они содержат Fc-участок, который способствует антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Несколько вариантов Fc уже описано в этой связи, например, Lazar et al., 2006; Moore et al., 2010.

Такие антитела или конъюгаты используются при лечении рака.

Под раком понимают любой тип рака и предпочтительно рак может быть выбран из рака мочевого пузыря, рака почки, уrogenитального рака и меланомы. Другими неограничивающими примерами раковых болезней или неопластических состояний являются лейкемия, базальноклеточная карцинома, рак молочной железы, злокачественная мезотелиома, актинический кератоз, светлоклеточный рак почки,

ретинобластома, карцинома клеток шиповатого слоя, карцинома *in situ*, колоректальный рак, карцинома яичника, кожная Т клеточная лимфома, эндометриальная аденокарцинома, классическая лимфома Ходжкина, карцинома легких, кожная В клеточная лимфома, рак желудка, ампулярный рак, рак желчных протоков, аденокарцинома протоков поджелудочной железы, плоскоклеточный рак пищевода, хорионаденома.

Во время вирусных инфекций повышающая регуляция экспрессии HLA-G определяет часть стратегии, используемой некоторыми вирусами для того, чтобы избежать разрушения, обусловленного иммунной системой.

Неограничивающими примерами вирусных инфекций, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, являются инфекции HIV, инфекции вирусом бешенства или инфекции, вызванные вирусами гепатита В или гепатита С, а также инфекция HCMV (цитомегаловирус человека), HSV-1 (вирус простого герпеса) или IAV (вирус гриппа А).

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, заключенное в состав вместе с фармацевтическим носителем. При использовании в описании "фармацевтический носитель" включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и средства, задерживающие абсорбцию, и т.п., являющееся физиологически совместимым. Предпочтительно носитель является пригодным для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композицию настоящего изобретения можно вводить с помощью целого ряда способов, известных в данной области техники. Путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов.

Выборный уровень дозирования будет зависеть от целого ряда факторов, включая способ введения, возраст, пол, вес, состояние, общее здоровье и предшествующую историю болезни пациента, подвергающегося лечению, и т.д. Например, антитело изобретения может вводиться в дозировке 0,2-20 мг/кг от 3 раз/неделю до 1 раза/месяц.

В другом аспекте медикамент или вакцина является композицией, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело или фрагмент, или вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

Вектор предпочтительно является вирусным вектором, например, выбранным из группы, состоящей из ретровирусных векторов, лентивирусных векторов, аденовирусных векторов, векторов на основе вируса осповакцины, векторов поксвируса, векторов вируса кори и аденовирус-ассоциированных векторов.

Нуклеиновая кислота, вектор или композиция могут вводиться непосредственно, или они могут быть упакованы в липосомы или нанесены на коллоидные золотые частицы до введения. В отдельном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело изобретения, может вводиться в "голой" форме.

Для генетической иммунизации вакцинные композиции предпочтительно вводятся внутрикожно, подкожно, внутримышечно в опухоли или в лимфоидные органы любого типа с помощью инъекции или газопроводной бомбардировки частицами и доставляются в эффективном количестве, чтобы стимулировать иммунный ответ в организме-хозяине. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения введение включает стадию электропорации, также определяемую в данном описании термином "электроблоттинг" в дополнение к стадии введения.

Нуклеиновые кислоты также можно вводить *ex vivo* в лимфоидные или миелоидные клетки при помощи липосомальной трансфекции, бомбардировки частицами или вирусной трансдукции (включая методы совместного культивирования). Затем обработанные клетки вводят обратно субъекту для иммунизации.

В еще одном аспекте иммуногенный пептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный пептид, или вектор, экспрессирующий указанный пептид, используется для продуцирования *in vivo* aНТН-HLA-G-антител у пациента.

Диагностические способы и наборы.

Изобретение также предоставляет средства, пригодные для *in vitro* обнаружения белков HLA-G или мониторинга или диагностирования состояния здоровья или патологического состояния, а также средств для мониторинга или диагностирования состояния здоровья или патологического состояния у субъекта, подверженного проявлению такого статуса или состояния.

В отдельном варианте осуществления состояние представляет собой рак или вирусную инфекцию.

В частности, изобретение имеет отношение к способу обнаружения *in vitro* белка HLA-G в образце и/или мониторинга или диагностирования состояния здоровья или патологического состояния путем анализа образца, ранее полученного от пациента, склонного к проявлению характерного состояния здоровья или имеющего патологическое состояние, указанный способ включает

а) контактирование образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как раскрывается в описании, при условиях, дающих возможность формирования иммунных комплексов; и

b) обнаружение *in vitro*, полученных в результате иммунных комплексов, образованных между указанными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами и HLA-G белком.

Согласно отдельному варианту осуществления настоящее изобретение дает возможность обнаружения *in vitro* белка HLA-G в образце, например образце, ранее полученном от пациента, предрасположенного вследствие беременности, или образце, полученном от пациента, который подвергся трансплантации(ям) органа или ткани или клетки. В результате может быть проведен мониторинг состояния здоровья, т.е. физиологического состояния, которое необязательно включает наличие патологического состояния. Следовательно, также может быть проведено последующее диагностирование наличия или отсутствия патологического состояния.

В том случае, когда образец был ранее получен от пациента, склонного к проявлению патологического состояния, также может быть проведен последующий мониторинг или диагностирование такого патологического состояния. В отдельном варианте осуществления патологические состояния являются раскрытыми выше состояниями.

Изобретение также имеет отношение к набору для *in vitro* анализа или диагностического метода, как раскрывается выше, при этом указанный набор содержит

- a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как раскрывается в описании;
- b) реагент(ы), подходящие для образования иммунного комплекса(ов) между антителом (a) или его антигенсвязывающим фрагментом и образцом для анализа;
- c) необязательно реагент(ы), подходящие для обнаружения формирования иммунного комплекса(ов) стадии b).

Обнаружение белка HLA-G может осуществляться с помощью любого метода, известного в данной области техники, такого как иммуногистохимия или обнаружение в жидкой фазе, например, анализа ELISA. Согласно отдельному варианту осуществления предоставляется набор, содержащий

(a) подложку, имеющую иммобилизованное анти-HLA-G антитело, связанное с ней, при этом анти-HLA-G антитело является антителом изобретения; и

(b) подвижное анти-HLA-G антитело (которое связывается с другим эпитопом белка HLA-G), имеющее репортерную молекулу, связанную с ним.

Репортерная молекула может быть любой молекулой, которая является обнаружимой количественно или полуколичественно. Например, репортерная молекула может быть колориметрическим агентом, флуориметрическим агентом, радиоизотопом или ферментным агентом, имеющим обнаружимую конечную точку.

Способ согласно изобретению необязательно может содержать стадию измерения HLA-G путем сравнения количества метки, обнаруженной в биологическом образце, с стандартным образцом HLA-G.

Способ согласно изобретению предусматривает наличие биологического образца. Такой образец может быть выбран без ограничения из образца ткани, например, образца опухолевой ткани, образца крови, среды, содержащей образец ткани, и среды, содержащей клетку, например, в том случае, когда используются изолированные клетки, амниотической жидкости, среды, контактирующей с эмбрионом. Изобретательский способ может использоваться для диагностирования или установления HLA-G индикативного состояния. В этом варианте осуществления контрольное значение для индикативного по HLA-G состояния может быть сравнено с количеством HLA-G, найденным в образце. Некоторые состояния могут быть определены в том случае, если HLA-G является низким или отсутствует, в то время как на другие могут указывать повышенные уровни HLA-G. Специалист в данной области может легко определить индикативные уровни, подходящие для диагностирования состояния. Такие индикативные по HLA-G состояния могут включать, но не ограничиваются этим, преэклампсию, повышенный риск преэклампсии, неблагоприятный исход для плода, повышенный риск неблагоприятного исхода для плода, рак или повышенный риск развития рака.

Также стало известно о растворимом HLA-G (sHLA-G) как о биомаркере качественного состояния эмбриона при оплодотворении *in vitro* у человека (IVF). В отдельном варианте осуществления антитела изобретения, таким образом, используются для мониторинга присутствия белка HLA-G в супернатантах эмбриональной культуры (ES), для того, чтобы оценить вероятность успеха имплантации в условиях IVF.

Таким образом, настоящее изобретение, в основном описанное выше, легче будет понято с учетом следующих примеров, которые предоставляются для иллюстрации и не предназначаются для ограничения настоящего изобретения.

### Сокращения

- APC: антиген-презентирующая клетка;
- ATCC: Американская коллекция типовых культур;
- $\beta$ 2M: бета-2-микроглобулин;
- BSA: бычий сывороточный альбумин;
- CDR: определяющие комплементарность области (гипервариабельные участки);
- CFA: полный адъювант Фрейнда;
- CTL: цитотоксические Т лимфоциты;
- CTLA-4: цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4;

DC: дендритная клетка;  
DIC: диизопропилкарбодиимид;  
DNA: дезоксирибонуклеиновая кислота;  
DMEM: среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко;  
ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ;  
ЕС: эффективная концентрация;  
FACS: сортировка флуоресцентно-активированных клеток;  
FCS: эмбриональная телячья сыворотка;  
FITC: флуоресцеинизотиоцианат;  
FR: каркасный участок;  
ч: час;  
НАТ: гипоксантин-аминоптерин-тимидин;  
НЕС: гидроксипропилкрахмал;  
HLA: лейкоцитарный антиген человека;  
HPLC: высокоэффективная жидкостная хроматография;  
HRP: пероксидаза хрена;  
ICP: иммунная контрольная точка;  
ID: идентичность;  
IFA: неполный адъювант Фрейнда;  
IgG: иммуноглобулин G;  
ILT-2: иммуноглобулин-подобный транскрипт 2;  
ILT-4: иммуноглобулин-подобный транскрипт 4;  
IMDM: среда Дульбекко в модификации Искова;  
IP: внутрибрюшинно;  
IPTG: изопропил β-D-1-тиогаляктопиранозид;  
IV: внутривенно;  
IVF: in vitro оплодотворение;  
kDa: килодальтон;  
KIR2DL4: домены иммуноглобулиноподобных рецепторов 2 Ig киллерных клеток с длинным цито-  
плазматическим концевым сегментом 4;  
KLH: гемоцианин лимфы улитки;  
LILRB1: лейкоцитарный иммуноглобулиноподобный рецептор B1;  
LILRB2: лейкоцитарный иммуноглобулиноподобный рецептор B2;  
M: моль;  
MEM: минимальная питательная среда;  
MHC: главный комплекс гистосовместимости;  
мл: миллилитры;  
NK: натуральная клетка-киллер;  
nM: наномоль;  
OD: оптическая плотность;  
ON: на протяжении ночи;  
PAGE: электрофорез в полиакриламидном геле;  
PBS: фосфатно-буферный солевой раствор;  
PC-1: пептид с ограниченной конформационной свободой-1;  
PCR: полимеразная цепная реакция;  
PD-1: белок 1 запрограммированной смерти клетки;  
PD-L1: лиганд 1 запрограммированной смерти клетки;  
PE: фикоэритрин;  
PIR-B: парный иммуноглобулиноподобный рецептор B;  
PS: пенициллин/стрептомицин;  
RNA: рибонуклеиновая кислота;  
RPM: число оборотов в минуту;  
RT: комнатная температура;  
SB: супер-питательная среда;  
scFv: одноцепочечный вариабельный фрагмент;  
SDS: додецилсульфат натрия;  
с: секунда;  
SEQ: последовательность;  
sHLA-G: растворимый HLA-G;  
TBS: Трис-буферизированный физраствор;  
TMB: тетраметилбензидин;  
UV: ультрафиолет;

V: объем;  
 VH: переменная тяжелая цепь;  
 VL: переменная легкая цепь;  
 мл: микролитры.

### Примеры

Материалы и методы.

Синтез пептидов.

PC-1 пептид [VTNHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56)], использованный для получения моноклональных антител, был синтезирован с помощью стандартных методов Fmoc с применением DIC в качестве активатора на Sygo от компании MultiSynTech и затем очищен с помощью обращенно-фазовой HPLC (RP-HPLC).

Пептид PC1 исследовали с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LCMS).

Получение иммуногена.

PC1 пептид был соединен с KLH через боковую цепь C-концевого цистеина, как описано далее: для конъюгации использовали 5 мг пептида. Белок KLH (77600, ThermoFisher, Париж, Франция), растворенный в PBS, был активирован с помощью сульфо-MBS линкера (22312, ThermoFisher, Париж, Франция). Свободный линкер удаляли с помощью диализа. Пептид, растворенный в PBS, инкубировали с активированным KLH. Свободный пептид удаляли с помощью диализа. Комплекс PC-1-KLH растворяли в PBS 1X (pH7.2) и хранили при -20°C.

Иммунизация мышей.

Для иммунизации использовали две разные мышинные линии (C57BL/6J и BALB/cJ), купленные в Janvier laboratories (Le Genest-St-Isle, Франция) и выращенные в виварии Института Пастера (Париж, Франция). Возраст мышей после первой иммунизации был 7 недель. Мышей иммунизировали с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции эмульсии 50 мкг PC-1 пептида, конъюгированного с KLH, смешанного с полным адьювантом Фрейнда (CFA F5881; Sigma, Лион, Франция) (об/об), а затем через 10 дней 1 IP инъекцией 50 мкг PC-1-KLH, смешанного с неполным адьювантом Фрейнда (IFA; F5506; Sigma, Лион, Франция) и затем 3 инъекциями 25 мкг PC-1-KLH/IFA на день 20, 30 и 185 после первой инъекции.

PC1-KLH/CFA или IFA эмульсию готовили при помощи вортекса в течение 30 мин при RT в темноте.

Антительный ответ контролировали в плазме из крови, полученной из ретроорбитального синуса иммунизированных мышей, с помощью проточной цитометрии (FACS) и анализов ELISA (как описано ниже).

Получение гибридом.

Мышам внутривенно (IV) вводили иммуноген за 3 дня до эвтаназии. Извлекали селезенку и очищали спленоциты для последующего слияния с линией иммортализованных миеломных клеток sp2/0-Ag14 для того, чтобы получить антитело-продуцирующие гибридомы. Слияние проводили с использованием стандартного протокола на основе полиэтиленгликоля (Köhler, G., C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 1975, 256(5517): p. 495-7). Затем полученные в результате гибридомы культивировали в селективной среде DMEM с добавлением L-глутамина (4 мМ), инактивированного нагреванием FCS (20%), НАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин, 1X), HES (гидроксиэтилкрахмал 130, 2%) и пенициллин/стрептомицин (1%). Гибридомам давали расти в течение от 7 до 14 дней в селективной среде для колониеобразования и продуцирования антител. Выработку антител, которые специфически распознают линейный и циклический PC-1 пептид, оценивали с помощью анализа ELISA и проточной цитометрии соответственно. Положительные гибридомы клонировали и выращивали, для того, чтобы идентифицировать полученные одноклеточные клоны, секретирующие представляющие интерес моноклональные антитела.

Технология фагового дисплея.

Создание библиотеки генов анти-HLA-G одноцепочечных антител.

После последней стимуляции брали селезенку от каждого животного, для того чтобы выделить РНК с помощью набора Tri Reagent kit (Molecular Research Center Inc., Цинциннати, США), согласно инструкциям производителя. Проводили обратную транскрипцию РНК с помощью RT-PCR и полученную в результате кДНК амплифицировали с помощью PCR с использованием праймеров, предназначенных для амплификации ДНК, кодирующей мышинные VH, VL<sub>κ</sub> и VL<sub>λ</sub>. PCR-продукты были сначала клонированы в вектор pGEM®-T easy vector (Promega, Мэдисон, Висконсин), согласно инструкциям производителя, давая в результате две подбиблиотеки генов антител, кодирующих или тяжелую (VH), или легкую (VL<sub>κ</sub>+VL<sub>λ</sub>) цепь.

Создание библиотеки одноцепочечных антител (scFv) было осуществлено, как описано далее:

во-первых, VL (VL<sub>κ</sub> и VL<sub>λ</sub>) PCR-продукты были клонированы в фагмидный вектор pTH;

во-вторых, VH PCR-продукты были клонированы в pTH, содержащий VL<sub>κ</sub> или VL<sub>λ</sub>, репертуар.

Сайт клонирования содержит (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> линкерную последовательность, фланкированную сайтами рестрикционного фермента для VH и VL клонирования, за которыми следует гексагистидиновая метка и

с-тус метка. Плазмиды и фагмиды были выращены в бактериях E.coli XL1-Blue MRF (Stratagene, Амстердам, Нидерланды). Трансформированные бактерии, содержащие scFv генную библиотеку, собирали, и из библиотеки выделяли плазмиды/фагмиды при помощи набора Nucleobond Plasmid Midi Kit (Macherey-Nagel; Дюрен, Германия) согласно инструкциям производителя, затем делили на аликвоты и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Размер окончательной библиотеки scFv составлял  $1.2 \times 10^7$  клонов, содержащих приблизительно 93% полноразмерных вставок, как показано при помощи PCR. Затем библиотека бактерий была упакована как библиотека фагов/scFv при помощи хелперных фагов M13KO7. Фаги/scFv были получены при  $30^{\circ}\text{C}$  и 250 об/мин в течение 16 ч. Клетки осаждали центрифугированием и супернатант, содержащий фаги, осаждали, используя метод с применением полиэтиленгликоля. Осажденные фаги ресуспендировали, фильтровали через 0,45 мМ фильтр и хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  до титрования фагов.

Скрининг библиотеки.

Скрининг фаговой/scFv библиотеки проводили с использованием 1 мкг/мл биотинилированного PC1 пептида, нанесенного на стрептавидиновые планшеты для ELISA с высокой пропускной способностью (15501, Piese). Было проведено пять раундов пэннинга в условиях повышенной жесткости (2, 4, 8 и 15 промывок для каждого последующего раунда пэннинга). Свободный HLA-G PC1 пептид (10 мкг/мл в TBS-Твине 20 0,1%) использовали в качестве конкурента для элюирования фагов/scFv. Для восстановления и амплификации отобранных фагов экспоненциально растущую культуру E.coli инфицировали суспензией элюированного фага после каждого раунда пэннинга.

Для оценки реакционной способности отобранных фагов был проведен фаговый-ELISA с использованием биотинилированного HLA-G PC1 пептида в качестве антигена после каждого раунда пэннинга. После первого и второго раундов пэннинга сигнал был на том же самом уровне как исходный; после четвертого раунда пэннинга сигнал превосходил исходный уровень в три раза. Согласно технологии фагового дисплея такое повышение сигнала соответствует обогащению специфических связывающих молекул. Фагмидная ДНК была экстрагирована из библиотеки после пятого раунда пэннинга. 96 клонов было выделено и продуцировало на микротитрационных планшетах с глубокими лунками (Maxisorp, Nunc, Дания). Супернатанты, содержащие фаговые частицы, были протестированы с помощью метода фагового ELISA, было идентифицировано и секвенировано 6 PC1-специфических связывающих молекул (R4C-C3, R4C-B1, R4C-F2, R4C-F1, R4C-F12 и R5C-D8).

Получение scFv.

Для экспрессии белка фагмидные ДНК, выделенные из идентифицированных положительных связывающих молекул, были трансформированы в несупрессорный штамм HB2151 E.coli. Отдельные колонии, случайным образом выбранные с отобранных планшетов, были инокулированы в 5 мл SB среды (Super Broth) с добавлением карбенициллина и глюкозы (1%). Культуры инкубировали в течение ночи при перемешивании и  $37^{\circ}\text{C}$  и затем перенесли в крупномасштабные SB культуры (500 мкл культуры перенесли в 500 мл свежей SB среды). Экспрессию целевых белков индуцировали добавлением 1 мМ IPTG (изопрропил  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид), когда культуры достигали  $\text{OD}_{600}$  1. Клетки выращивали в течение ночи (ON) при  $16^{\circ}\text{C}$  и затем собирали центрифугированием. scFvs экстрагировали и очищали с помощью колонки для никель-хелатной хроматографии (Ni-NTA спин-колонка, Qiagen, Валенсия, CA) согласно инструкциям производителя.

Анализ с помощью проточной цитометрии.

Клеточные линии.

Клетки K562 представляют собой клетки лейкемии человека, купленные в ATCC (Американской коллекции типовых культур CCL-243). K562-G1 и K562-PV были получены путем нуклеофекции K562 клеток дикого типа или с использованием вектора, кодирующего HLA-G1, или соответствующего ложного вектора соответственно. Эти клеточные линии культивировали в среде IMDM с добавлением 10% инактивированной нагреванием FCS и 1% пенициллин/стрептомицина.

Лимфобластные клеточные линии LCL-DES, LCL-BRO и RPMI8866, экспрессирующие классические молекулы класса MHC I, но не экспрессирующие HLA-G, были любезно предоставлены D. Wiels (Институт Густава Русси, Вильжюиф, Франция). Эти клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FCS, 1% пенициллин /стрептомицина, 10 мМ пирувата натрия и 200 г/л D-глюкозы.

Гранулы Bioplex, рецепторы и моноклональное антитело.

Гранулы Bioplex (MC10028-01 и MC10062-01) были куплены у компании Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, Франция), PE-конъюгированный мышинный IgG1 (клон P.3.6.8.2.1. 12-4714) у компании Biosciences (Париж; Франция) и FITC-конъюгированный крысиный IgG2a у компании BD Biosciences (клон: R35-95 553929, Le Pont de Claix; Франция).

Получение белков HLA-G6 и HLA-G5.

Последовательности генов, кодирующие домены  $\alpha 1\alpha 3$  HLA-G6 и домены  $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$  HLA-G5, были клонированы в бакуловирусный вектор pAcGP67 для переноса генов. Генетические конструкции и амплификация плазмид бакуловирусных векторов pAcGP67, содержащих различные вставки, были выпол-

нены Genecust (Люксембург). Плазмиды были амплифицированы в DH5 бактериальном хозяине в установке Proteople в Институте Пастера (Париж, Франция). Векторы для переноса и линейаризованная ДНК AcMNPV (BaculoGold™ от компании BD) были котрансфицированы в клетки *Spodoptera frugiperda* (Sf9), обеспечивая возможность рекомбинации между гомологичными сайтами, переносимыми вставки от вектора переноса в ДНК AcMNPV. Были получены рекомбинантные вирусы, кодирующие каждый из белков, которые использовались для инфицирования Sf9 клеток, продуцирующих затем рекомбинантные белки.

После того как рекомбинантные белки были экспрессированы, клетки лизировали и лизат перенесли на аффинную колонку с иммобилизованной StrepTactin смолой. После нескольких стадий промывки для удаления неспецифически связанных белков, связанные StrepTag белки элюировали при помощи 2,5 мМ дестиобиотина. Очищенные элюированные белки анализировали с помощью SDS-PAGE, чтобы подтвердить присутствие HLA-G5, и затем делили на аликвоты и хранили при -20°C.

Связывание гранул Bioplex.

Гранулы Bioplex покрывали рекомбинантными белками HLA-G5, HLA-G6 или синтетическим циклическим cPC-1 пептидом (СТНHPVFDYEATLRC, SEQ ID NO: 52), следуя стандартной процедуре химического соединения через амин с использованием набора, предоставленного Bio-Rad (Marnes-la-Coquette; Франция), согласно инструкциям производителя. В качестве специфических (отрицательных) контролей использовали непокрытые гранулы и гранулы, покрытые мутированным пептидом СТНHPVADAEATLRC (SEQ ID NO: 62) соответственно.

Был создан циклический пептид cPC-1, чтобы имитировать конформационную структуру VTНHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56) аминокислотного участка в положениях 189-203 в домене α3 HLA-G, установленную предшествующими кристаллографическими исследованиями (Clements et al., 2005). Конформационная имитация была получена путем замены N-концевого остатка валина пептида PC-1 остатком цистеина, что приводило к образованию дисульфидной связи между N- и C-концевыми остатками цистеина.

Анализ анти-HLA-G сыворотки и моноклональные антитела.

Обнаружение специфических анти-HLA-G антител в сыворотке иммунизированных мышей или в супернатантах культур клоногенных клеток гибридомы проводилось с помощью проточной цитометрии. Проточную цитометрию проводили сначала с использованием гранул, покрытых HLA-G5, HLA-G6 и пептидом cPC-1.

Гранулы инкубировали с разными разведениями сыворотки или супернатантов клеточных культур, содержащих моноклональные антитела, в течение 1 ч при RT, затем промывали два раза и инкубировали в течение 30 минут при RT с PE-конъюгированными козьими анти-мышинными антителами IgG (405307, Biolegend, США). Проточную цитометрию проводили с помощью LSR FORTRESSA (Beckton Dickinson, Le Pont-de-Claix, Франция); результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo X (Tree star, Ashland, США). Для определения процента положительно окрашенных гранул электронные "ворота" были установлены так, чтобы исключить 99% флуоресцентных гранул с изотипическим контролем. Таким образом, положительно окрашенные гранулы были определены как гранулы с интенсивностью окрашивания выше, чем интенсивность окрашивания, которую показывает 99% изотипического контроля.

Анализ ELISA.

96-луночные микропланшеты покрывали пептидом PC-1 при 1 мкг/мл в PBS (100 мкл/лунку), инкубировали в течение ночи при RT и затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку PBS-сухого обезжиренного молока в течение 1 ч при RT. После одной промывки PBS твин 0.05% добавляли разведения сыворотки или моноклональные антитела (50 мкл/лунку) в течение 2 ч при RT. Планшеты три раза промывали и добавляли конъюгированный с пероксидазой (HRP) козий анти-мышь IgG при разведении 1/10000 в PBS-твин 0.05%, 1% BSA (50 мкл/лунку) в течение 1 ч при RT. После трех промывок планшеты окрашивали субстратом ТМВ (KPL, Гейтерсберг, США) и снимали показания при OD450.

Для фагового дисплея HLA-G PC1 свободный пептид или соединенный с BSA наносили на 96-луночные микротитровальные планшеты (Maxisorp, Nunc, Дания). Обнаружение проводили, используя антитело против гистидиновой метки (Qiagen, Courtaboeuf, Франция).

Дополнительные характеристики моноклонального антитела 15E7.

Изотипирование.

Изотип 15E7 был определен с помощью анализа ELISA с использованием набора Clonotyping Southern kit, (Clinisciences, Нантер, Франция) согласно инструкциям производителя. Коротко, планшеты покрывали иммобилизованным антителом (специфическим для каждого изотипа) в течение ночи при 4°C, а затем промывали два раза PBS 0.05% Твин. Затем давали планшетам нагреться до комнатной температуры и добавляли супернатант гибридом, содержащий моноклональное антитело 15E7, на 1 ч при RT. HRP-конъюгированные анти-изотипические вторичные антитела, предоставленные в наборе, использовали при 1/2000. Планшеты окрашивали субстратом ТМВ (Eurobio/KPL, Гейтерсберг, США) и снимали показания при OD<sub>450</sub>.



Получение моноклонального антитела 15E7.

Гибридому 15E7 выращивали *in vivo* в виде асцита у мышей. После достаточного роста для получения желательного моноклонального антитела, асцитную жидкость, содержащую моноклональное антитело, очищали. Очистку проводили с помощью хроматографии с использованием стандартной сефарозной колонки с протеином А. Элюционные фракции, содержащие 15E7, объединяли, диализировали и концентрировали по необходимости. Концентрацию определяли как OD<sub>280</sub> с использованием UV сканирования и устанавливали 2 мг/мл.

Определение аффинности связывания (BLITZ-технология).

Аффинность связывания и кинетические параметры связывания были определены с помощью BLITZ-технологии. Моноклональное антитело 15E7 было ковалентно связано с биосенсорным чипом AR2G (Pall ForteBio) с помощью первичных аминов с использованием стандартной химии связывания аминов. Связывание измеряли посредством инкубации чипа, соединенного с 15E7, с разными концентрациями пептида PC-1, соединенного с BSA. Кинетические параметры ассоциации антиген-антитело регистрировали в течение 120 с, и кинетические параметры диссоциации регистрировали в течение 100 с. Кривые ассоциации и диссоциации соответствовали 1:1.

Пример 1. Производство анти-HLA-G антител у мышей.

Дизайн иммуногена.

Изобретатели сконструировали высоко специфический пептид HLA-G, соответствующий аминокислотному участку 189-203  $\alpha 3$  HLA-G, упоминаемый как "пептид с ограниченной конформационной свободой: PC-1" (фиг. 1A; жирным шрифтом и подчеркнуто), и использовали для иммунизации мышей.

Последовательность PC-1: VTNHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56)

Ожидается, что иммуноген PC-1 будет генерировать терапевтически пригодные анти-HLA-G моноклональные антитела, специфичные в отношении  $\alpha 3$ -содержащих изоформ HLA-G независимо от соединения с P2M.

Иммунизация. Получение гибридомы и выработка scFv.

Протокол иммунизации с использованием пептида PC-1, соединенного с KLH, описан в разделе Материалы и Методы. Мышей C57BL/6 и BALB/c использовали для иммунизации пептидом.

Коротко мышей внутрибрюшинно примировали конъюгатом PC-1-KLH в CFA и стимулировали 4 IP в IFA. Сыворотку от иммунизированных мышей собирали в разные моменты времени параллельно с процедурой иммунизации и тестировали с использованием Bioplex-HLA-G5, HLA-G6 и cPC-1-связанных зерен. Для каждого эксперимента были взяты положительный и отрицательный контроли, чтобы определить специфическую аффинность полученных поликлональных антител. Сыворотка считалась положительной, если HLA-G-пептидные зерна показывали сдвиг пика на FACS по сравнению с зернами, мечеными с использованием сыворотки от неиммунизированных мышей.

В том случае, когда мыши BALB/c и C57BL/6 были иммунизированы пептидом PC-1-KLH, значительные уровни анти-HLA-G IgG антител обнаруживались в сыворотке после каждой IP бустер-инъекции. Фиг. 1B показывает окрашивание HLA-G5-покрытых гранул, полученных в присутствии сыворотки, собранной от иммунизированной Balb/c мыши и невакцинированной контрольной мыши. Важно отметить, что анти-HLA-G антитела обнаруживались дозозависимым образом даже при самых низких дозах сыворотки (разведение 1/1000). Не было обнаружено специфического связывания при использовании контрольных несвязанных зерен (результаты не показаны).

Мышей с самыми высокими титрами анти-HLA-G антител использовали для получения гибридом или для фагового дисплея.

Слияние было проведено, как подробно описано в разделе "Материалы и методы". Положительные по ELISA гибридомы были затем клонированы и были верифицированы снова с помощью ELISA для того, чтобы обнаружить представляющие интерес клоны, продуцирующие анти-HLA-G моноклональные антитела.

Способ фагового дисплея осуществляли так, как подробно описано в разделе "Материалы и методы". Реакционная способность клонов scFv R4C-C3, R4C-B1, R4C-F2, R4C-F1 и R5C-D8 в отношении пептидов HLA-G была оценена с помощью ELISA. Клоны R4C-C3 и R5C-D8 показали высокую реакционную способность в отношении соединенного с биотином пептида PC1 (фиг. 1C). R4C-C3 реагировал с изоформами протеина HLAG.

Клон гибридомы 15E7 и клоны scFv R4C-C3 были отобраны для дальнейшего исследования.

Пример 2. Генетическая характеристика мышинных моноклональных антител 15E7 и scFv R4C-C3.

Последовательности кДНК, кодирующие вариабельные участки легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела 15E7 и R4C-C3 scFv, были получены при помощи стандартных методов PCR и секвенирования ДНК.

Моноклональное антитело 15E7.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельного участка легкой цепи 15E7 показаны на фиг. 2A.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельного участка тяжелой цепи 15E7

показаны на фиг. 3А.

Наиболее значительная вариабельность в легкой и тяжелой цепях располагается главным образом в пределах гипервариабельных участков, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), которые определяют специфичность антитела. Анализ последовательностей VL и VH 15E7 позволил установить CDR1, CDR2 и CDR3 участков легкой и тяжелой цепей, соответственно, как показано на фиг. 2А и 3А.

Последовательность 15E7 легкой цепи к сравнили с известными мышинными последовательностями легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 2В). Легкая цепь 15E7 использует сегмент VL из мышинной зародышевой линии IGKV1-117 и JK сегмент из мышинной зародышевой линии IGKJ1.

Сравнение последовательности тяжелой цепи ( $\gamma$ ) 15E7 с известными мышинными последовательностями тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии продемонстрировало, что тяжелая цепь 15E7 использует VH сегмент из мышинной зародышевой линии IGHV1-61, JH сегмент из мышинной зародышевой линии IGHJ2 и DH сегмент из мышинной зародышевой линии IGHD4-1 (фиг. 3В).

Эти сравнения аминокислотных последовательностей указывают на значительную гомологию последовательностей тяжелой (93,1%) и легкой (94,6%) цепей 15E7 с соответствующими мышинными зародышевыми линиями. Изменения в последовательности легкой цепи расположены по всей длине FR1 и FR4, а также в CDR1 и CDR3 участках (фиг. 2В), тогда как замены в последовательности тяжелой цепи главным образом ограничиваются участками CDR и FR3 (фиг. 3В). Таким образом, эти результаты демонстрируют, что моноклональное антитело 15E7 является мышинным IgG, которое подвергли процессу созревания аффинности и приобрело сильно выраженную специфичность/аффинность в отношении специфического эпитопа HLA-G.

Клон scFv R4C-C3.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельных участков легкой цепи scFv R4C-C3 показаны на фиг. 4А.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи R4C-C3 показаны на фиг. 5А. Были проанализированы последовательности VL и VH scFv R4C-C3, и были установлены CDR участки легкой и тяжелой цепей, как показано на фиг. 4А и 5А.

Последовательности scFv R4C-C3 легких цепей к сравнили с известными мышинными последовательностями легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии. Это выравнивание показало, что легкая цепь scFv R4C-C3 использует сегмент VL из мышинной зародышевой линии IGKV1-110 и JK из мышинной зародышевой линии IGKJ1. Выравнивание последовательностей между scFv R4C-C3 и их соответствующими мышинными сегментами зародышевой линии показаны на фиг. 4В и 5В.

Сравнение последовательности тяжелой цепи ( $\gamma$ ) scFv с известными мышинными последовательностями тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии показало, что эта цепь использует сегмент VH из мышинного IGHV1S126 зародышевой линии, JH сегмент из мышинной IGHJ2 зародышевой линии и сегмент DH из мышинной IGHD2-12 зародышевой линии. Выравнивания последовательностей между VH scFv R4C-C3 и его соответствующими сегментами мышинной зародышевой линии показаны на фиг. 5В. Аминокислотное выравнивание показало, что последовательности легкой и тяжелой цепей scFv R4C-C3 являются на 96,4 и 82,8% гомологичными с последовательностями зародышевой линии. Замены в последовательностях легкой цепи главным образом располагаются в участках CDR3 (фиг. 4В), тогда как изменения в последовательности тяжелой цепи расположены по всем FR1, FR2, FR3 и всем CDR (фиг. 5В). Высокая частота мутаций в последовательности тяжелой цепи подтверждает, что scFv R4C-C3 подвергся процессу созревания аффинности и приобрел значительно выраженную аффинность в отношении пептида, производного от HLA-G.

Пример 3. Характеристика анти-HLA-G моноклонального антитела 15E7.

Анализ белка.

Моноклональное антитело 15E7 было проанализировано с помощью гель-электрофореза SDS-PAGE (фиг. 6А). Молекулярный вес тяжелой цепи составляет около 50 kDa и легкой цепи около 25 kDa. При наличии двух копий каждой, молекулярный вес 15E7 составляет до 150 kDa, подтверждая, что моноклональное антитело 15E7 принадлежит к мышинному IgG 2а классу.

Изотипирование и определение аффинности.

Изотип 15E7 был оценен методом ELISA. Было установлено, что изотип 15E7 был IgG2а.

Аффинность 15E7 была оценена с помощью BLITZ технологии, как описано в разделе "Материалы и методы". Характерные результаты показаны на фиг. 6В. Различные концентрации пептида PC-1, конъюгированного с BSA, в пределах от 5 до 600 нМ, инкубировали с 15E7, присоединенным к биосенсорному чипу. Для каждой концентрации были измерены скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) и использованы для вычисления константы аффинности  $K_D$  ( $k_a/k_d$ ), которая составляла 1.57 нМ.

Специфичность к белкам HLA-G и пептидам.

Для того чтобы определить реакционную способность 15E7 с HLA-G5 и белком G6 и пептидом PC-1, было проведено титрование на основе проточной цитометрии.

Антитело 15E7 титровали с помощью серийного разведения на h $\beta$ 2М-свободном HLA-G5, зернах,

покрытых HLA-G6 и пептидом сPC-1, а также на их отрицательных эквивалентах (непокрытые зерна или зерна, покрытые мутированным пептидом). Результаты, представленные на фиг. 7А, 7В и 7С, показывают, что 15Е7 сильно связывается с пептидом сPC-1 со значением  $EC_{50}$  2 нг/мл, с рекомбинантным HLA-G5 белком со значением  $EC_{50}$  28 нг/мл и с рекомбинантным белком HLA-G6 со значением  $EC_{50}$  120 нг/мл соответственно. Этот анализ продемонстрировал способность 15Е7 специфически связываться с разными  $\beta$ 2М-свободными изоформами HLA-G.

Способность 15Е7 связываться со  $\beta$ 2М-свободной изоформой HLA-G1, экспрессированной на клеточной поверхности, также была оценена. Действительно К562-G1, экспрессирующие свободную изоформу HLA-G1, и клетки К562-PV были проинкубированы с серийными разведениями антитела 15Е7, и специфическое связывание было проанализировано с помощью проточной цитометрии в сравнении с изотипическим контролем (IgG2a). Результаты, представленные на фиг. 8, показывают, что 15Е7 специфически связывается с клетками К562-G1, но не связывается с клетками К562-PV, со значением  $EC_{50}$  5,0 мкг/мл.

Умеренная обработка кислотой высвобождает молекулы  $\beta$ 2М клеточной поверхности, при этом свободные тяжелые цепи HLA класса I остаются прикрепленными к клеточной поверхности (Polakova et al., 1993; Storkus et al., 1993). Экспрессия антигенов HLA-G на необработанных и обработанных при pH3.0 клетках К562-G1 была проанализирована с помощью проточной цитометрии с использованием MEM-G/9 mAb, направленного на нативные комплексы HLA-G/  $\beta$ 2М. В дополнение к этому, mAb, направленные против человеческого  $\beta$ 2m, использовали, чтобы контролировать эксперимент и подтвердить высвобождение последнего. MEM-G/9 mAb, а также анти- $\beta$ 2М mAb связываются с необработанными клетками К562-G1, тем не менее обработка кислотой уменьшала их связывание. В противоположность этому, мечение с помощью mAb 15Е7 увеличивало демонстрацию того, что оно распознает свободные от  $\beta$ 2М тяжелые цепи HLA-G (фиг. 9А). Клетки К562-PV использовали в качестве отрицательного контроля (фиг. 9В).

Такие же эксперименты были проведены на клетках JEG-3, экспрессирующих эндогенный комплекс HLA-G1/ $\beta$ 2М. mAb 15Е7 не связывалось с необработанными клетками JEG-3, однако окрашивание после обработки кислотой повышалось, тогда как окрашивание MEM-G/9 и анти- $\beta$ 2М mAb снижалось почти до исходных значений (фиг. 9С).

Эти результаты подтверждают, что Mab 15Е7 распознает иммуногенный пептид сPC-1 и эпитоп, экспрессированный на клеточной поверхности HLA-G в отсутствие  $\beta$ 2М.

Отсутствие перекрестной реактивности по отношению к классическим молекулам МНС I класса.

Как уже было упомянуто выше, одной из главных задач при создании анти-HLA-G моноклонального антитела было получение высокоспецифических антител к HLA-G с отсутствием перекрестной реактивности по отношению к классическим МНС молекулам I класса (МНС-I). Специфичность 15Е7 к HLA-G и отсутствие перекрестной реактивности с классическими МНС-I молекулами было оценено с помощью проточной цитометрии с использованием разных МНС-I-положительных линий клеток человека, которые не экспрессируют HLA-G.

Следует отметить, что клетки линий лимфомы человека (LCL-DES, LCL-BRO и RPMI8866), экспрессирующие человеческие классические молекулы МНС-I, но не экспрессирующие HLA-G на своей поверхности, окрашивались определенной концентрацией 15Е7 (20 мкг/мл; 133 нМ). Была использована эта концентрация, поскольку 80% клеток К562-G1 было окрашено, при этой дозировке не было обнаружено неспецифическое связывание с изотипическим контролем. Клетки К562-G1 и К562-PV использовали в качестве положительного и отрицательного контролей соответственно. Фиг. 10 показывает, что 15Е7 сильно связывается с HLA-G1 экспрессирующими клетками (К562-G1), тогда как негативные по HLA-G клетки, экспрессирующие классические молекулы МНС-I, не были окрашены. Это показывает, что моноклональное антитело 15Е7 является специфическим к белку HLA-G и не показывает какой-либо перекрестной реактивности по отношению к классическим молекулам МНС класса I.

Обсуждение.

Настоящая работа показывает, как получить анти-HLA-G антитела, основываясь на подходе с использованием иммунизации пептидом HLA-G. Разработанный пептид (PC-1), использованный для иммунизации, является высокоспецифичным в отношении HLA-G по сравнению с классическими молекулами МНС класса I и содержит аминокислоты, участвующие во взаимодействии полноразмерного HLA-G с его рецепторами LILRB1 и LILRB2.

Изобретатели показали, что несмотря на гидрофобные свойства этого участка  $\alpha$ 3 HLA-G возможно создание анти-HLA-G моноклональных антител с использованием различных технологий, слияния (получения гибридом) и фагового дисплея.

Анти-HLA-G антитела, описанные выше, способны распознавать несколько изоформ HLA-G. Эти антитела связываются с эндогенной клеточной поверхностью  $\beta$ 2М-свободного HLA-G1. Учитывая, что они не вступают в перекрестную реакцию с классическими молекулами МНС класса I, эти HLA-G специфические антитела могут использоваться для диагностических и терапевтических целей.

**Ссылки**

Agaugue S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 - versus Th1/Th17. *Blood* 2011; 117: 7021-31.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.

Blaschitz A, Hutter H, Leitner V, Pilz S, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. Reaction patterns of monoclonal antibodies to HLA-G in human tissues and on cell lines: a comparative study. *Hum Immunol* 2000; 61: 1074-85.

Carosella ED, et al., HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008; 29:125-32.

Carosella ED, et al., Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111:4862-70.

Carosella ED, et al., HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* 2015; 127:33-144.

Clements CS, Kjer-Nielsen L, Kostenko L, Hoare HL, Dunstone MA, Moses E, Freed K, Brooks AG, Rossjohn J, McCluskey J. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3360-5.

Desai SA, et al., Structural relatedness of distinct determinants recognized by monoclonal antibody TP25.99 on beta 2-microglobulin-associated and beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chains. *J Immunol* 2000; 165:3275-83.

Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* 1990; 144: 731-5.

Favier, B., HoWangYin KY, Wu J, Caumartin J, Daouya M, Horuzsko A, Carosella ED, LeMaout J. Tolerogenic function of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study in vivo. *PLoS One* 2011; 6: e21011.

Geraghty DE, Koller BH, Orr HR. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987. 84: 9145-9.

HoWangYin KY, Loustau M, Wu J, Alegre E, Daouya M, Caumartin J, Sousa S, Horuzsko A, Carosella ED, LeMaout J. Multimeric structures of HLA-G isoforms function

through differential binding to LILRB receptors. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69:4041-9.

Karlin S, Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2264-8.

Karlin S, Altschul SF. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5873-7.

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 4005–4010.

Liang S, Baibakov B, Horuzsko A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2418-26.

Menier C, et al., Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2003; 64:315-26.

Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9.

Moy FJ, et al., Analysis by HMR spectroscopy of the structural homology between the linear and the cyclic peptide recognized by anti-human leukocyte antigen class I monoclonal antibody TP25.99\*. *J Biol Chem* 2000; 275:24679-85.

Naji A, et al., Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. *J Immunol* 2014; 192:1536-46.

Polakova K, Karpatova M, Russ G. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol* 1993; 30:1223-30.

Qiu J, et al., Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6:2152-6.

Storkus WJ, Zej HJ, Salter RD, Lotze MT. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14: 94-103.

Tanabe M, Sekimata M, Ferrone S, Takiguchi M. Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I alpha 3 domain. *J Immunol* 1992; 148:3202-9.

Tripathi P, Agrawal S. The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection. *AIDS* 2007; 21:1395-404.

Yan WH, HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; 11:76-89.

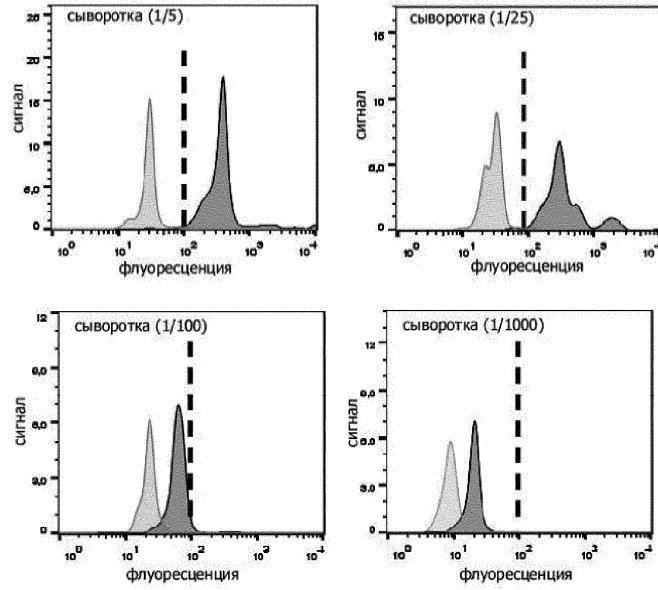
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Направленное против HLA-G антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит
  - (a) переменный участок тяжелой цепи (VH), включающий определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1) SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) SEQ ID NO: 10 и определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) SEQ ID NO: 12; и
  - (b) переменный участок легкой цепи (VL), включающий определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1) SEQ ID NO: 2, определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) последовательности KVS и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) SEQ ID NO: 5.
2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором VH включает SEQ ID NO: 64, а VL включает SEQ ID NO: 63.
3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, которое представляет собой полно-размерный иммуноглобулин G, содержащий две тяжелые цепи и две легкие цепи.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, являющееся химерным или гуманизированным.

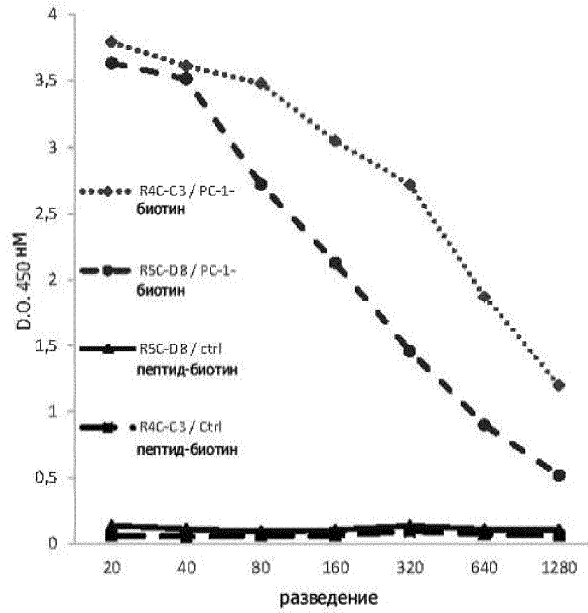
5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 4, где VH, VL или как VH, так и VL содержат последовательности каркасной области иммуноглобулина человека.
6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело содержит константную область иммуноглобулина.
7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>.
8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело является моноклональным.
9. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, связанные с цитотоксическим агентом.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и фармацевтический носитель.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по п.9 и фармацевтический носитель.
12. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую VH и VL антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1 или 2.
13. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.12.
14. Вектор по п.13, который является экспрессионным.
15. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.12.
16. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.
17. Способ получения направленного против HLA-G моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 при условиях, обеспечивающих возможность экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента.
18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2 для лечения рака или вирусной инфекции.
19. Конъюгат по п.9 для лечения рака или вирусной инфекции.
20. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1 или 2 в приготовлении диагностического набора для обнаружения или мониторинга HLA-G в биологическом образце.
21. Диагностический набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2.

домен	α 1
HLA-G	GSLSMRYSFAAVSRPGRGEPFRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNKAKAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA
HLA-E	GSLSLRKYPHTSVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDDNDAASPRMVPAPWMEQEGSEYWDRETRRSARDTAQIFRVNLTLRGYYNQSEA
HLA-A2	GSLSMRYPFTSVSRPGRGEPFRFIAMGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWVEQEGPEYWDGGETRKKVKAHSQTHRVDLGLTRGYYNQSEA
HLA-B7	GSLSMRYPFTSVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPREPRAPWVEQEGPEYWDRTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEA
HLA-B44	GSLSMRYPCTAVSRPGRGEPHFIAVGYVDDTQFVRFDSDESPRGEPAPWVERKGPYWDRETQKYKPAQATDRVSLRNLRGYYNQSEA
HLA-CW3	GSLSMRYPFTASRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDSDATSPRKEPRAPWVEQEGPEYWDRETQISKTNQTQYRENLRTAARYNQSEA
остатки	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90
домен	α 2
HLA-G	SSHTLQWMIGCDLGSGRLLRGYEQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCEVWLHRYLENGKEMLRQA
HLA-E	GSHTLQWMHGCBLGPDGRFLRGYEQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQISEQKSNDASEAHQRAYLEGTCEVWLHRYLENGKELHL
HLA-A2	GSHTVORMYGCDSVGRDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKHKEAAHVAEQRAYLEGTCEVWLRYLENGKETLQRT
HLA-B7	GSHTLQSMYGCDSVGRDGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGTCEVWLRYLENGKDLERA
HLA-B44	GSHTLRMYGCDVGRDGRLLRGYDQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRAYLEGTCEVWLRYLENGKETLQCA
HLA-CW3	GSHTLQRMYGCDSVGRDGRLLRGYDQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRAYLEGTCEVSLRYLENGKETLQRA
остатки	.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180..
домен	α 3
HLA-G	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMRWK
HLA-E	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMRWK
HLA-A2	DAPKTHMTHNVAVDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B7	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDRTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B44	DHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
HLA-CW3	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDVELVETRPAGDRTFFQKWAAVVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
остатки	.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....

Фиг. 1А



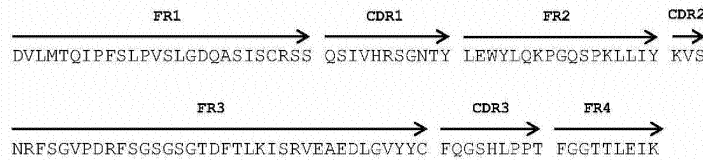
Фиг. 1В



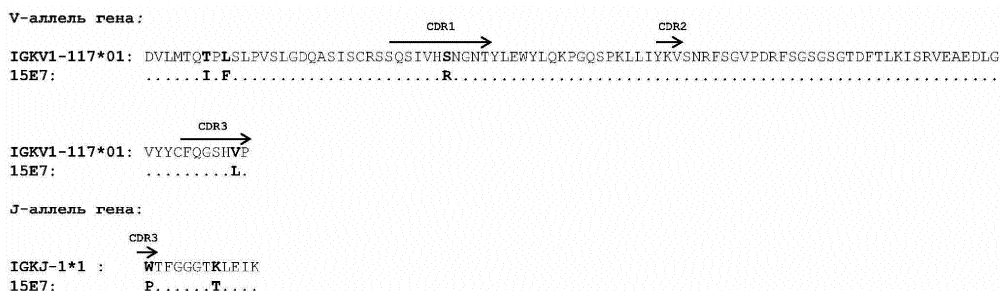
Фиг. 1С

**15E7-VL<sub>K</sub>**

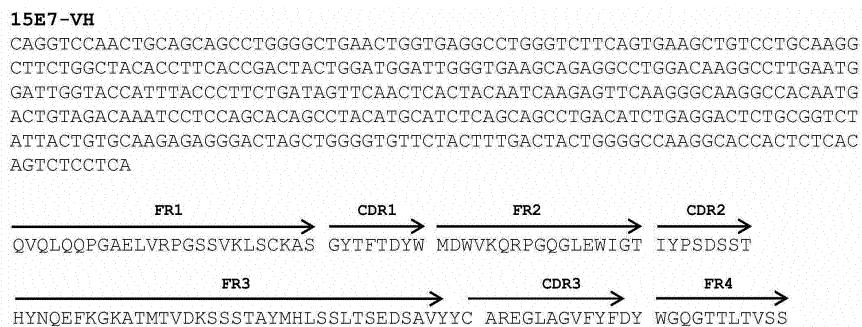
GATGTTTTGATGACCCAAATTCATTCCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTG  
 CAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGAAGTGGAAACACSTATTTAGAGTGGTACCTGCAGAAGCCAG  
 GCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCCAGACAGGTTCCAGT  
 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCAACSTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTA  
 TTA CTGCTTTCAAGGTTACATCTTCTCCGCGTTTCGTTGGAGGCCACCACGCTGGAAATCAAA



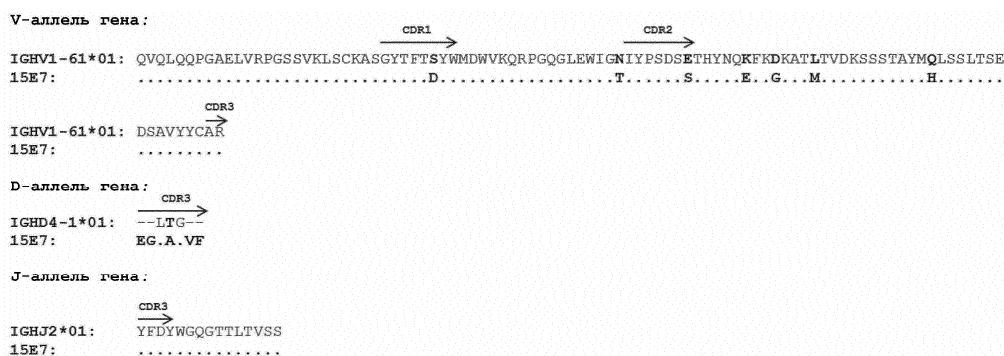
Фиг. 2А



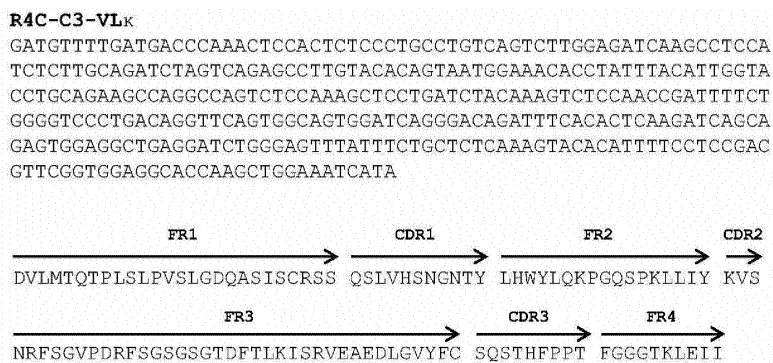
Фиг. 2В



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4А



**V-аллель гена:**

→ CDR1
→ CDR2

IGKV1-110\*01: DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
R4C-C3: ..L.....

→ CDR3

IGKV1-110\*01: KISRVEAEDLVYFCSQSTHVP  
R4C-C3 : .....F.

**J-аллель гена:**

→ CDR3

IGKJ1\*01: WTFGGGTKLEIK  
R4C-C3: P.....I

Фиг. 4B

**R4C-C3-VH**

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGCTCAGCTGGTTAGGCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGGCTT  
CTGGTTACTCATTACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAAGGCTTGTGAGTGGATTGG  
CATGATTGCTCCTCCGATAGTGATAGTAGGTTAAATCAGAATTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGAC  
AAATCCTCCAGCACAGCTACATGCAACTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA  
GAGAGGGAGTTACAATGATAACGACGGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

→ FR1
→ CDR1
→ FR2
→ CDR2

QVQLKQSGPQLVRFPGASVKIPCKAS GYSFTNYW MHWVKQRPGGLEWIGM IAPSDSDS

→ FR3
→ CDR3
→ FR4

RLNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC AREGVTMITTGLDY WGQGTTLTVSS

Фиг. 5A

**V-аллель гена:**

→ CDR1
→ CDR2

IGHV1S126-1: QVQLQQPGAELVKPGASVKISCKASGYFTTSYWMNWKQRPGGLEWIGEIDPSDSYTNNNQKFKDKATLTVDKSSST  
R4C-C3: ....K.S..Q..R.....P.....S..N..H.....M.A....DSRL..N.....

→ CDR3

IGHV1S126-1: AYMQLSSLT-SEDSAVYYCAR  
R4C-C3: .....P.Q.....

**D-аллель гена:**

→ CDR3

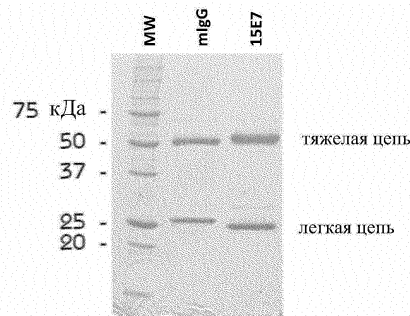
IGHD2-12\*01: PTIVT-IVT  
R4C-C3: -EG..M.T.

**J-аллель гена:**

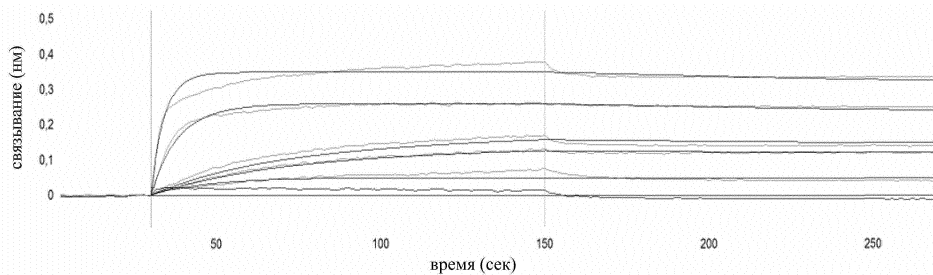
→ CDR3

IGHJ2\*01: YFDYWGQGTTLTVSS  
R4C-C3: GL.....

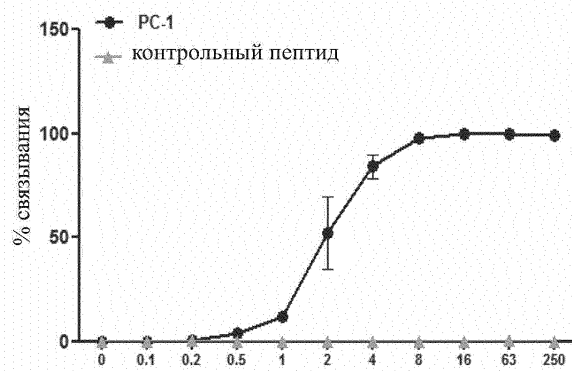
Фиг. 5B



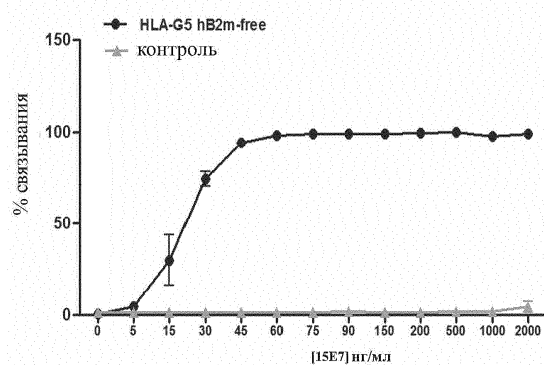
Фиг. 6A



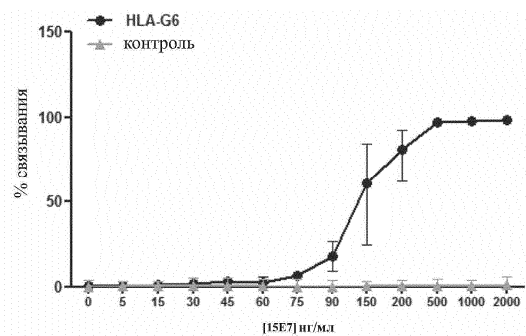
Фиг. 6B



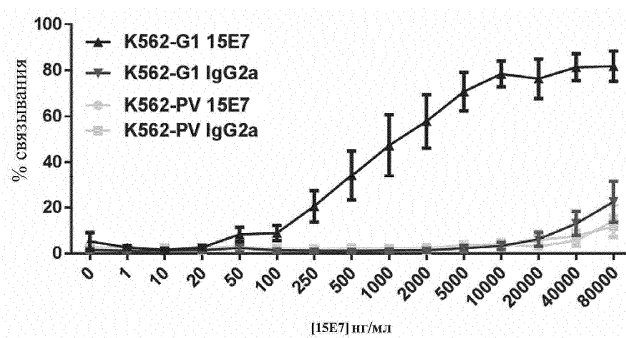
Фиг. 7А



Фиг. 7В

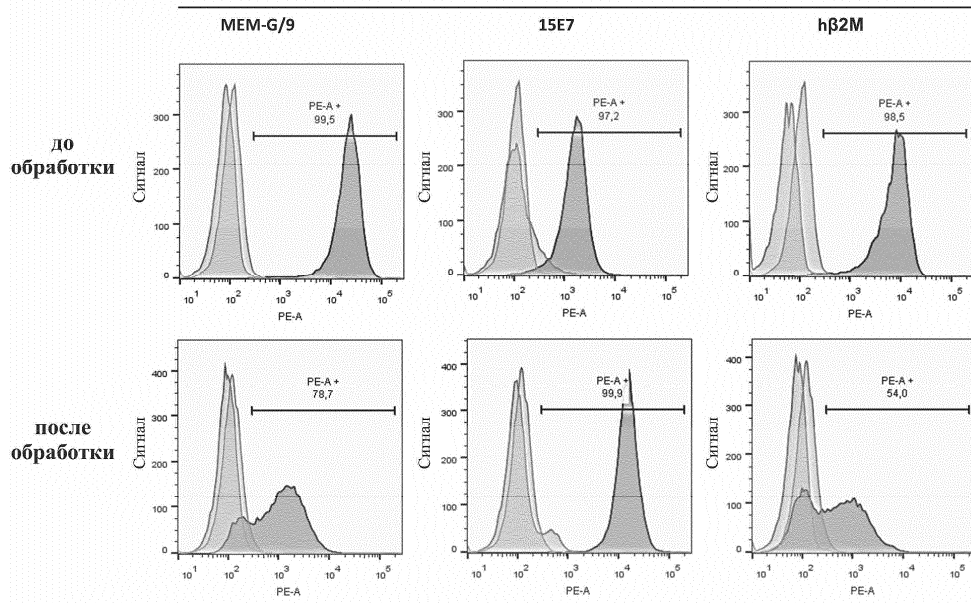


Фиг. 7С



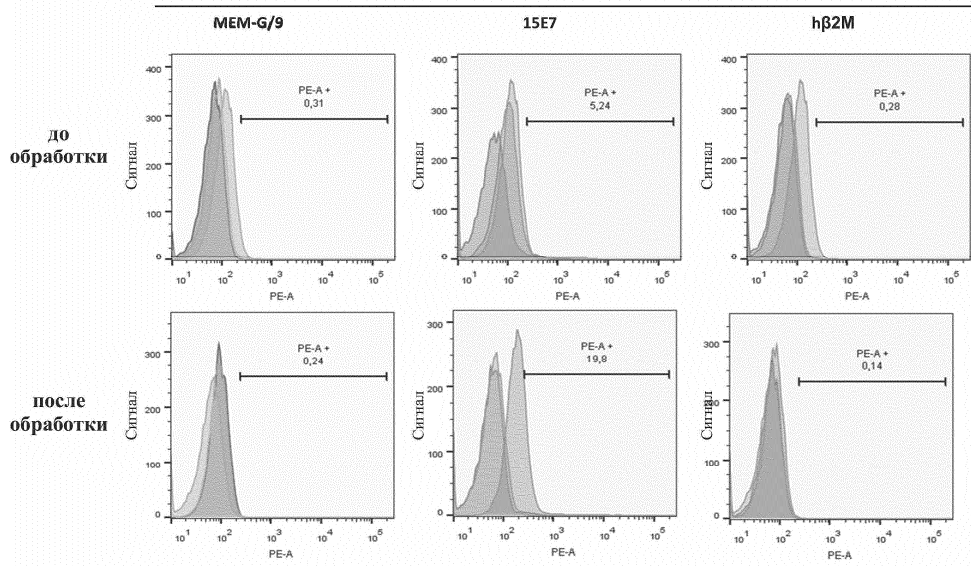
Фиг. 8

K562-G1

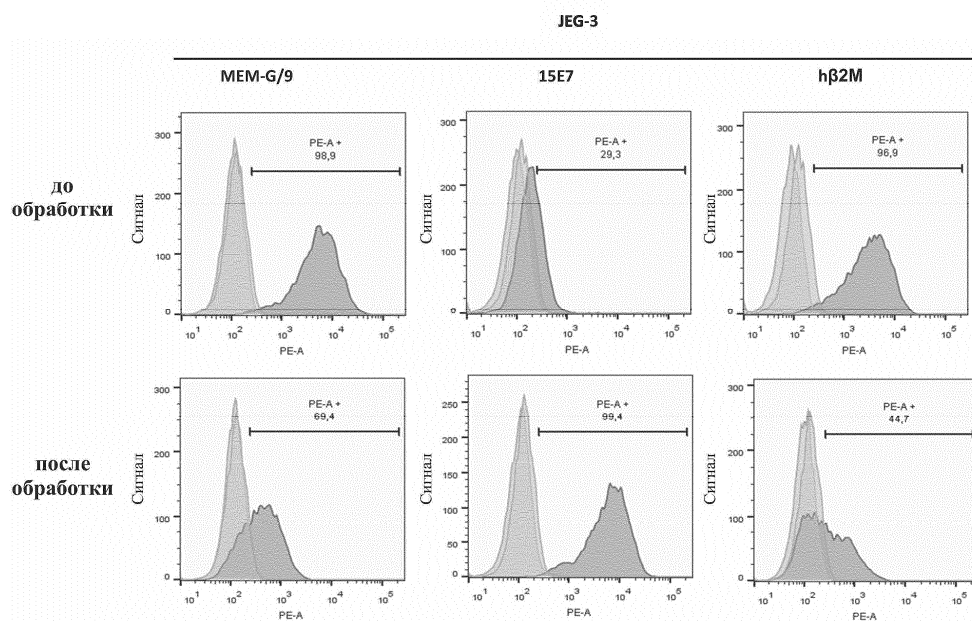


Фиг. 9А

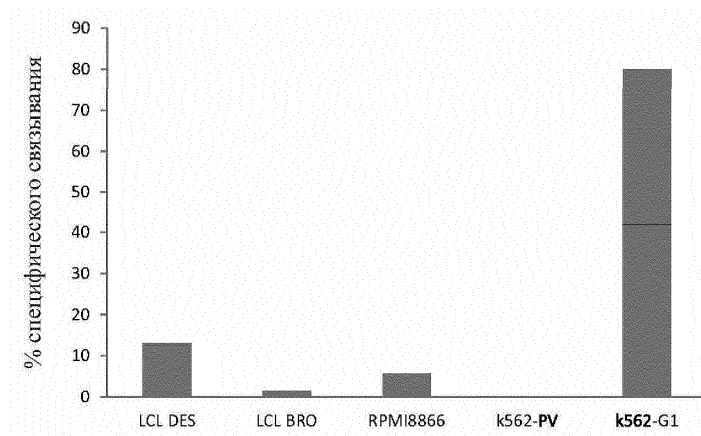
K562-PV



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 10

