

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391025 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.19(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2021.09.29

## (54) АНТИТЕЛА К CD94 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/085,932; 63/088,926

(72) Изобретатель:

(32) 2020.09.30; 2020.10.07

Томасевич Ненад, Ши Жо Ши (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2021/052668

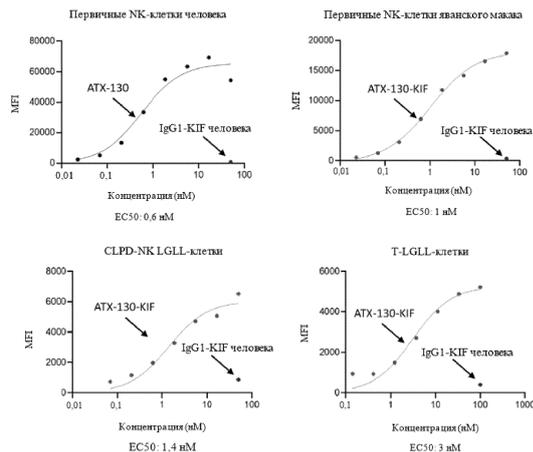
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2022/072508 2022.04.07

(71) Заявитель:

ДРЕН БАЙО, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с CD94 человека, а также к связанным с ними способам, применениям, полинуклеотидам, векторам, клеткам-хозяинам и фармацевтическим композициям. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела, которые связываются с CD94 человека и не блокируют связывание между CD94 и HLA-E. В некоторых вариантах осуществления антитела перекрестно реагируют с CD94 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела не способствуют интернализации CD94, экспрессируемого на поверхности, в той мере, в какой это делают существующие антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела способствуют нацеливанию ADCC на клетки, которые экспрессируют CD94 человека, например на клеточной поверхности.



A1

202391025

202391025

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577777EA/023

### АНТИТЕЛА К CD94 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Настоящая заявка претендует на приоритет предварительных заявок США с серийными номерами 63/085932, поданной 30 сентября 2020 г., и 63/088926, поданной 7 октября 2020 г., раскрытия каждой из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[02] Содержание следующего представления в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 186542000340SEQLIST.TXT, дата записи: 28 сентября 2021 г., размер: 52 165 байт).

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[03] Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с CD94, и к их применению для лечения заболеваний и нарушений, связанных с NK-клетками и/или T-клетками.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Естественные киллеры (NK)/T-клеточные лимфомы и лейкозы характеризуются клональной экспансией NK и/или CD8+ и CD4+ T-клеток. NK/T-клеточные лимфомы составляют небольшой процент неходжкинских лимфом (NHL) и имеют 5-летнюю выживаемость менее 50% (Kwong, 2012). Только в Соединенных Штатах ежегодно регистрируется примерно 4000-7000 новых пациентов, с более высокой частотой в азиатском населении (Bajaj, A. (2019) Int. J. Hematol. Ther 5:1-7). NK/T-клеточная лимфома может возникнуть в любом возрасте, и более половины пациентов с NHL старше 65 лет (Bajaj, 2019). Существуют также лейкозы на основе NK и T-клеток, такие как LGL и агрессивный NK-лейкоз. Другие примеры заболеваний и нарушений, в которых играют роль NK-клетки, включают лейкоз LGL (*например*, T-клеточный лейкоз LGL), хронические лимфопролиферативные заболевания NK-клеток (CLPD-NK, ранее NK-LGL), ревматоидный артрит, синдром Фелти, агрессивный NK-лейкоз (*например*, агрессивный лейкоз естественных киллеров (ANKL) и экстранодальный NKL назального типа (ENKL)), IBM и IBD.

[05] Существует тринадцать различных заболеваний, связанных с NK/T-клеточной лимфомой: экстранодальная NK/T-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная T-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммуобластная TCL, взрослая TCL, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL и подкожная панникулитная TCL

(Вајај, 2019). Основные подтипы НК/Т-клеточной лимфомы, которые в основном обусловлены цитотоксическими клетками (НК/CD8+ Т-клетки), включают экстранодальную НК/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL, связанную с энтеропатией TCL, мономорфную эпителиотропную кишечную TCL, эпидермотропную CD8+ кожную TCL, первичную кожную гамма/дельта TCL и подкожную панникулитную TCL. НК/Т-клеточная лимфома поражает различные органы, такие как кожа, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), печень, селезенка и костный мозг. Симптомы включают увеличение шейных лимфатических узлов. Большинство подтипов НК/Т-клеточной лимфомы вызваны инфекцией вируса Эпштейна.

[06] Текущие способы лечения включают химиотерапию (циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) с последующей трансплантацией стволовых клеток; но выживаемость без прогрессирования остается на уровне 40-50%. Текущие исследуемые препараты включают алемтузумаб, карфилзомиб (ингибитор протеасом), ромидепсин (ингибитор HDAC), бевацизумаб, брентуксимаб ведотин (конъюгат антитело-лекарственное средство), бортезомиб (ингибитор протеасом), белинонат (ингибитор HDAC), пралатрексат, вориностат (ингибитор HDAC), и авелумаб. Несмотря на разнообразие разрабатываемых препаратов, многие из них часто используются не по прямому назначению и дают неоднозначные результаты.

[07] В настоящее время не существует эффективных методов лечения НК/Т-клеточной лимфомы, и не разработана терапия, которая избирательно нацелена на НК/Т-клеточную лимфому. Современные способы лечения НК/Т-клеточной лимфомы могут иметь побочные эффекты и не совсем эффективны. Высокая смертность от заболевания в сочетании с отсутствием эффективных способов лечения подчеркивают необходимость терапевтических достижений при НК/Т-клеточной лимфоме.

[08] Соответственно, в данной области техники существует потребность в разработке безопасных и эффективных способов лечения заболеваний, опосредованных НК-клетками и/или Т-клетками, которые экспрессируют CD94, таких как НК/Т-клеточная лимфома.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[09] Для удовлетворения этих и других потребностей в настоящем изобретении предлагаются, *среди прочего*, антитела, которые специфически связываются с CD94 (*например*, CD94 человека), способы лечения заболеваний или повреждений, связанных с НК-клетками и/или Т-клетками, которые экспрессируют CD94, *например*, НК /Т-клеточные лимфомы и лейкозы (*например*, лейкоз LGL), а также способы истощения или снижения количества НК-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, у субъекта при введении антитела, которое специфически связывается с CD94. Эти антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из следующих характеристик: высокая аффинность связывания с CD94 человека (*например*, клетки, экспрессирующие CD94 человека на своей поверхности), перекрестная реактивность с CD94 яванского макака (полезно для доклинических исследований), способность

связывания CD94 человека без блокирования его взаимодействия с HLA-E, минимальная интернализация после связывания с CD94 и/или индукция ADCC против клеток, экспрессирующих CD94, таких как лейкоэмические клетки. Эти характеристики считаются полезными, *например*, для тестирования, разработки и использования при лечении заболеваний, вызванных NK/T-клетками, таких как лимфомы и лейкозы. Например, не желая быть связанными теорией, считается, что нацеливание CD94 на NK-клетки для ADCC может индуцировать раковые клетки (*например*, лейкоэмические клетки LGL или клетки лимфомы) для уничтожения других раковых клеток.

[010] В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрены человеческие или гуманизированные антитела, которые связываются с CD94 человека, где связывание антитела с CD94 человека не блокирует связывание между CD94 человека и HLA-E человека. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD94 человека, экспрессированный на поверхности клетки (*например*, человеческой естественной клетки-киллера (NK)). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с внеклеточным доменом CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD94 яванского макака, экспрессированного на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с клетками, экспрессирующими CD94 человека, блокирует менее 20% связывания HLA-E с CD94 человека. В других аспектах в настоящем документе предусмотрены человеческие или гуманизированные антитела, которые связываются с CD94 человека и CD94 яванского макака (*например*, которые способны связываться с CD94 человека и CD94 яванского макака по отдельности). В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD94 человека, экспрессированный на поверхности клетки (*например*, человеческой естественной клетки-киллера (NK)). В некоторых вариантах осуществления антитело связывает CD94 яванского макака, экспрессируемый на поверхности клетки (*например*, NK-клетки яванского макака или клетки, такой как клетки человека, которые сверхэкспрессируют CD94 яванского макака). В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с CD94 человека не блокирует связывание между CD94 человека и HLA-E человека. В некоторых вариантах осуществления инкубация антитела с клеткой, экспрессирующей CD94 человека на ее поверхности, в течение 24 часов при 37°C приводит к снижению окрашивания поверхности антитела менее чем на 50% вследствие интернализации.

[011] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную

































аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70; (d) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; (e) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; (f) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76; (g) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78; (h) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или (i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82.

[012] В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрены антитела, которые связываются с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере



идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело.

[013] В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрены антитела, которые связываются с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом: (а) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35;

























последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:78; (h) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 99% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 99% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:80; или (i) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 99% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:81, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 99% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82. В некоторых вариантах осуществления (a) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; (b) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68; (c) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70; (d) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; (e) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; (f) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76; (g) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78; (h) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; or (i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82.

[014] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены антитела, которые связывают тот же эпитоп, что и антитело, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связывают тот же самый эпитоп, что и эталонное антитело. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит домен VH, содержащий CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и домен VL, содержащий CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит домен VH, содержащий CDR-H1,



содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52; (f) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; (g) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; (h) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; или (i) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

[015] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены антитела, которые конкурируют с антителом в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления за связывание с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению конкурируют за связывание с CD94 человека с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит домен VH, содержащий CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и домен VL, содержащий CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую



содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46; (e) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52; (f) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; (g) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; (h) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; или (i) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

[016] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела или одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит Fc-область, *например*, Fc-область IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит нефукозилированную Fc-область человека. В некоторых вариантах осуществления антитело продуцируется в клеточной линии (*например*, клеточной линии CHO), дефицитной по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, такому как FUT8. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческим клеточным Fc-гамма-

рецептором ША в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клетки, экспрессирующей CD94 человека на своей поверхности.

[017] В дополнительных аспектах в настоящем документе предоставлены полинуклеотиды, кодирующие антитело в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. Кроме того, в настоящем документе предусмотрены векторы (*например*, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотид(-ы) в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. Кроме того, в настоящем документе представлены клетки-хозяева (*например*, выделенные клетки-хозяева или клеточные линии), содержащие полинуклеотид(-ы) или векторы в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления. Кроме того, в настоящем документе предусмотрены способы получения антитела, включающие культивирование клетки-хозяина в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления в условиях, подходящих для выработки антитела. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выделение антитела из клетки-хозяина.

[018] Кроме того, в настоящем документе предусмотрены композиции (*например*, фармацевтические композиции), содержащие антитело в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[019] В дополнительных аспектах в настоящем документе предусмотрены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению количества LGL или NK-клеток периферической крови у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой синдром Фелти, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов синдрома Фелти у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой миозит с тельцами-включениями, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов миозита с тельцами-включениями у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой агрессивный NK-лейкоз, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или более симптомов агрессивного NK-лейкоза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или более симптомов ревматоидного артрита у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой лейкоз LGL, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лейкоза LGL у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой CLPD-NK, и при этом введение антитела субъекту приводит к

уменьшению одного или нескольких симптомов CLPD-NK у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой лимфому из клеток естественных киллеров (NK) или Т-клеток, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лимфомы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL, TCL взрослых, мономорфную эпителиотропную кишечную TCL, эпидермотропную CD8+ кожную TCL, первичную кожную гамма/дельта TCL или подкожную панникулитную TCL. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой микроскопический колит, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов микроскопического колита у субъекта.

[020] В дополнительных аспектах в настоящем документе предусмотрены способы снижения количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены способы индукции активности ADCC у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления. В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены способы лечения CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к улучшению одного или нескольких симптомов CLPD-NK у субъекта.

[021] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены способы лечения лимфомы естественных киллеров (NK) или Т-клеточной лимфомы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления антитело не связывается с тем же эпитопом на CD94 человека, что и клоны антител к CD94 HP-3D9, HP-3B1, DX22, 131412 или 12K45. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD94 человека с большей аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3D9, HP-3B1, DX22, 131412 и 12K45. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому, печеночно-

селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL или TCL взрослых. В некоторых вариантах осуществления НК-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную НК/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией.

[022] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены способы усиления терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) у человека, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления до введения субъекту терапии CAR-T. В некоторых вариантах осуществления введение антитела или композиции приводит к истощению НК-клеток у субъекта перед получением лечения с помощью CAR-T.

[023] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены способы истощения CD8<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> Т-клеток у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления введение антитела или композиции приводит к истощению CD8<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> Т-клеток у субъекта.

[024] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение субъекту полипептида IL-2.

[025] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, субъектом является человек.

[026] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления для применения в: лечении заболевания или нарушения у субъекта, снижении количества LGL и/или НК-клеток в периферической крови у субъекта, лечении CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, лечении лимфомы из естественных клеток-киллеров (НК) или Т-клеточной лимфомы, лечении микроскопического колита у субъекта или усилении терапии CAR-T у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления НК-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную НК-/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL, TCL взрослых, мономорфную эпителиотропную кишечную TCL, эпидермотропную CD8<sup>+</sup> кожную TCL, первичную кожную гамма/дельта TCL или подкожную панникулитную TCL. В некоторых вариантах осуществления НК-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную НК/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL,

ассоциированную с энтеропатией.

[027] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлено применение антител или композиций в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, *например*, для производства лекарственного препарата, для применения в: лечении заболевания или нарушения у субъекта, снижении количества LGL и/или NK-клеток в периферической крови у субъекта, лечении CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, лечении лимфомы из естественных клеток-киллеров (NK) или Т-клеточной лимфомы, лечении микроскопического колита у субъекта или усилении терапии CAR-T у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL или TCL взрослых. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией.

[028] В дополнительных аспектах в настоящем документе представлены наборы или изделия, содержащие антитела или композиции в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат инструкции по использованию наборов, *например*, в лечении заболевания или нарушения у субъекта, снижении количества LGL и/или NK-клеток в периферической крови у субъекта, лечении CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, лечении лимфомы из естественных клеток-киллеров (NK) или Т-клеточной лимфомы, лечении микроскопического колита у субъекта или усилении терапии CAR-T у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL, TCL взрослых, мономорфную эпителиотропную кишечную TCL, эпидермотропную CD8+ кожную TCL, первичную кожную гамма/дельта TCL или подкожную панникулитную TCL. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией.

[029] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит шесть CDR одного антитела, указанного в таблице 1 (например, антитела 18H3, 1M4, 1E4, ATX-122, ATX-123, ATX-124, ATX -125, ATX-126, ATX-127, ATX-128, ATX-

129 или АТХ-130). В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит домен VH и VL одного антитела, указанного в таблице 2 (например, антитела 18НЗ, 1М4, 1Е4, АТХ-122, АТХ-123, АТХ-124, АТХ -125, АТХ-126, АТХ-127, АТХ-128, АТХ-129 или АТХ-130).

[030] Все ссылки, цитируемые в данном документе, включая патентные заявки и публикации, полностью включены в качестве ссылки.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[031] Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения можно получить, обратившись к следующему подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемым графическим материалам.

[032] **На фиг. 1** показана аффинность антитела к CD94 18НЗ к первичным естественным клеткам-киллерам (NK) человека, измеренная с помощью проточной цитометрии. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здорового донора HD-40 использовали для окрашивания антителами. Антитело 18НЗ титровали от 100 нМ до 0,046 нМ в разведении 1:3 и инкубировали с PBMC. Антитела к CD3 и CD56 использовали для идентификации NK-клеток в потоке рассеяния. Связывание антитела 18НЗ с яркими NK-клетками CD3+ и CD56 использовали для оценки аффинности 18НЗ. Кривые титрования и EC50 были построены с помощью Graphpad Prism. 18НЗ связывался с яркими NK-клетками CD3+CD56 с аффинностью 2,6 нМ. В качестве контролей использовали изотипический контроль IgG1 человека с вторичным антителом (hIgG1) и козым (Fab)2-фрагментом только AF647, специфичным к человеческому Fcy-специфичному вторичному антителу (вторичное Ab).

[033] **На фиг. 2** показано связывание антител к CD94 с первичными NK-клетками человека, измеренное с помощью проточной цитометрии. Супернатанты антитело к CD94-гибридомы подвергали скринингу на первичных NK-клетках человека с помощью проточной цитометрии. HP-3D9 представляет собой коммерческое антитело к CD94, которое использовали в качестве положительного контроля. Мышиные IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 использовали в качестве отрицательного контроля. Антитела к CD94 18НЗ, 1М4 и 1Е4, связанные с CD94, экспрессированными на первичных NK-клетках человека.

[034] **На фиг. 3А-3В** показана перекрестная реактивность антител к CD94 по отношению к CD94 яванского макака. **На фиг. 3А** показана перекрестная реактивность антител гибридомы к CD94 яванского макака. Супернатанты антитело к CD94-гибридомы подвергали скринингу на клетках HEK293, экспрессирующих CD94 яванского макака, с помощью проточной цитометрии на перекрестную реактивность с CD94 яванского макака. HP-3D9 представляет собой коммерческое антитело к CD94, которое использовали в качестве отрицательного контроля. Мышиные IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 использовали в качестве отрицательного контроля. 18НЗ, 1М4 и 1Е4 перекрестно

реагировали с CD94 яванского макака, тогда как 20F2 является примером другого клона антитела к CD94, который взаимодействует с CD94 человека, но не дает перекрестной реакции с CD94 яванского макака. На **фиг. 3В** показана перекрестная реактивность коммерческих антител к CD94 яванского макака. Коммерчески доступные антитела к CD94 использовали для тестирования перекрестной реактивности яванского макака. 18НЗ использовали в качестве положительного контроля. MFI каждого антитела нормализовали к MFI его соответствующего изотипа. HP-3В1, 131412, 12К45, DX22 и HP-3D9 не давали перекрестной реакции с CD94 яванского макака, в отличие от 18НЗ.

[035] На **фиг. 4** показаны результаты анализов блокирования тетрамера HLA-E, проведенных с антителом к CD94 и коммерчески доступными антителами к CD94 с использованием проточной цитометрии. PBMC здоровых доноров инкубировали с антителами к CD94. Затем тетрамер HLA-E, меченный PE, инкубировали со смесью клеток и антител и определяли с помощью проточной цитометрии. Для HP-3В1, 131412, 12К45, DX22, 1М4 и 1Е4 использовали 2,5 мкл тетрамерного реагента HLA-E, тогда как для 18НЗ и HP-3D9 использовали 5 мкл. В этом анализе использовали насыщающие концентрации каждого антитела. Процент блокировки рассчитывали как  $100 - ((\text{процент положительных результатов HLA-E для антитела к CD94})/(\text{процент положительных результатов HLA-E для изотипа})) * 100$ . Антитела 18НЗ и 1Е4 не блокировали связывание HLA-E с CD94.

[036] На **фиг. 5А-5В** показаны результаты конкурентных анализов, выполненных для оценки антитела 18НЗ к CD94. Для всех конкурентных анализов 18НЗ инкубировали с PBMC в концентрации 1,3 мкг/мл. На **фиг. 5А** показаны конкурентные анализы между 18НЗ и коммерчески доступными антителами к CD94. Коммерчески доступные антитела к CD94 титровали и инкубировали с PBMC одновременно с 18НЗ. На **фиг. 5В** показаны конкурентные анализы с 18НЗ и другими гибридными антителами к CD94, описанными в настоящем документе (1М4 и 1Е4). Чтобы проверить конкурирование между 18НЗ и 1М4/1Е4, 1М4 и 1Е4 инкубировали с клетками при концентрациях 8,5 мкг/мл и 11 мкг/мл соответственно. 18НЗ было флуоресцентно помечено AF647 и инкубировано с клетками одновременно с 18НЗ-AF647. 18НЗ лишь частично конкурировало с HP-3D9, и не конкурировало с DX22, HP-3В1, 131412, 12К45, 1Е4 и 1М4. Эти результаты позволяют предположить, что антитело 18НЗ связывается с эпитопом, который не является общим с коммерчески доступными антителами.

[037] На **фиг. 6А-6В** показаны результаты конкурентных анализов, выполненных для оценки антитела 1М4 к CD94. Для всех конкурентных анализов 1М4 инкубировали с PBMC в концентрации 8,5 мкг/мл. На **фиг. 6А** показаны конкурентные анализы между 1М4 и коммерчески доступными антителами к CD94. Коммерчески доступные антитела к CD94 титровали и инкубировали с PBMC одновременно с 1М4. На **фиг. 6В** показаны конкурентные анализы с антителами 1М4 и 1Е4. Для проверки конкуренции между 1М4 и 1Е4 1Е4 инкубировали с клетками в концентрации 11 мкг/мл. 1М4 с мышинным вторичным антителом инкубировали с клетками одновременно с 1Е4. Антитело 1М4 не

конкурировало с коммерчески доступными антителами, но конкурировало с 1E4.

[038] **На фиг. 7** показаны результаты конкурентных анализов, выполненных для оценки антитела 1E4 к CD94. Для всех конкурентных анализов 1E4 инкубировали с РВМС в концентрации 11 мкг/мл. Коммерчески доступные антитела к CD94 титровали и инкубировали с РВМС одновременно с 1E4. Антитело 1E4 не конкурировало с четырьмя из пяти протестированных коммерчески доступных антител к CD94, но частично конкурировало с 12K45.

[039] **На фиг. 8А-8В** показаны результаты анализа интернализации антитела к CD94. Мононуклеарные клетки периферической крови здорового донора (РВМС) инкубировали с неконъюгированными антителами к CD94 в различные моменты времени в диапазоне от 30 минут до 24 часов. Клетки хранили либо при 4°C для предотвращения интернализации, либо при 37°C для индуцирования интернализации. **На фиг. 8А** показаны результаты для коммерчески доступных антител HP-3D9 и DX22. Коммерчески доступные антитела к CD94 интернализировали в зависимости от времени. **На фиг. 8В** показаны результаты для антител 18НЗ, 1М4 и 1Е4. Антитела 18НЗ, 1М4 и 1Е4 не интернализировались в значительной степени при связывании с CD94.

[040] **На фиг. 9А-9В** показаны результаты анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) для антитела к CD94 с использованием РВМС здорового донора. Антитело 18НЗ было получено в клетках Ехр1-СНО, культивируемых в присутствии кифунензина, мощного ингибитора фермента маннозидазы I, который используется для получения нефукозилированного антитела, имитирующего 18НЗ-КИФ. Фукозилированное антитело 1Е4 использовали для анализа ADCC. РВМС помещали в 96-луночные планшеты и инкубировали в присутствии антитела к CD94 в диапазоне от  $1 \times 10^{-6}$  до 10 мкг/мл в 10-кратных разведениях в течение ночи. Количество НК-клеток определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Количество НК-клеток в условиях, обработанных человеческим IgG1 и антителом к CD94, нормализовали к количеству НК-клеток в лунках, обработанных человеческим IgG1. **фиг. 9А** показаны результаты анализа ADCC с использованием человеческого антитела IgG1 18НЗ, а на **фиг. 9В** показаны результаты анализа ADCC с использованием фукозилированного антитела 1Е4. Как человеческий IgG1 18НЗ, так и фукозилированный 1Е4 истощали первичные НК-клетки человека в зависимости от концентрации.

[041] **На фиг. 10** показаны результаты анализа ADCC антитела к CD94 с использованием РВМС пациентов с CLPD-НК. 18НЗ было получено в клетках Ехр1-СНО, культивируемых в присутствии кифунензина, мощного ингибитора фермента маннозидазы I для получения нефукозилированного антитела, имитирующего 18НЗ-КИФ. РВМС помещали в 96-луночные планшеты и инкубировали в присутствии антитела к CD94 в диапазоне от  $1 \times 10^{-6}$  до 10 мкг/мл в 10-кратных разведениях в течение ночи. Количество лейкозных клеток CD3-CD16+ определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Количество лейкозных клеток в условиях, обработанных человеческим IgG1 и антителом к CD94, нормализовали к количеству лейкозных клеток в

лунках, обработанных человеческим IgG1. Частично нефукозилированный человеческий IgG1 18H3 истощал человеческие CLPD-NK лейкозные клетки зависимым от концентрации образом.

[042] **На фиг. 11** представлена сводка характеристик антител к CD94 и функциональная оценка по сравнению с коммерчески доступными антителами к CD94.

[043] **На фиг. 12** показана аффинность антитела к CD94 ATX-130 к первичным естественным клеткам-киллерам (NK) человека и антитела к CD94 ATX-130-KIF к первичным естественным клеткам-киллерам (NK) яванского макака, хроническому лимфопролиферативному заболеванию NK-клеток (CLPD-NK) и Т-большим гранулярным лимфоцитарным лейкозным клеткам (Т-LGLL), измеренная с помощью проточной цитометрии. Антитело ATX-130 было получено в клетках Expi-CHO, культивируемых в присутствии кифунензина, мощного ингибитора фермента маннозидазы I, который используется для получения нефукозилированного антитела, имитирующего ATX-130-KIF. Для окрашивания антител использовали РВМС здоровых доноров. Антитело ATX-130 титровали в концентрации от 50 нМ до 0,02 нМ. Вторичное антитело человека, меченное Alexa Fluor 647, использовали для обнаружения связывания с яркими NK-клетками CD3-CD56. Антитело ATX-130-KIF, конъюгированное с Alexa Fluor 647, титровали в концентрации от 50 нМ до 0,02 нМ. Клетки Т-LGLL идентифицировали с использованием стратегии гейтирования CD3+CD16+, в то время как клетки CLPD-NK идентифицировали с использованием стратегии гейтирования CD3-CD16+. Кривые титрования и EC50 были построены с использованием Graphpad Prism. ATX-130 связывался с яркими NK-клетками CD3-CD56 с аффинностью 0,6 нМ. ATX-130-KIF показало аффинность 1 нМ к первичным NK-клеткам яванского макака, 1,4 нМ к клеткам CLPD-NK и 3 нМ к клеткам Т-LGLL. В качестве контроля использовали флуоресцентно меченное человеческое антитело IgG1-KIF изотип-KIF. Стрелки указывают точки данных ATX-130 и IgG1-KIF человека.

[044] **На фиг. 13** показана аффинность антитела к CD94 ATX-130 к гомодимеру или гетеродимеру CD94. Клетки BaF3, сверхэкспрессирующие гомодимер CD94 (верхняя панель), гетеродимер CD94/NKG2A (нижняя левая панель) и гетеродимер CD94/NKG2C (нижняя правая панель), инкубировали с неконъюгированным антителом ATX-130 в серии разведений от 50 нМ до 0,02 нМ. Вторичное антитело человека, меченное Alexa Fluor 647, использовали для обнаружения связывания ATX-130 на клетках. ATX-130 связывается с гомодимером CD94, CD94/NKG2A и клетками BaF3 гетеродимера CD94/NKG2C с аффинностью 0,3, 0,8 и 1,8 нМ соответственно.

[045] **На фиг. 14** показана секреция IFN-гамма на человеческих NK-клетках в присутствии антител ATX-130, как оценено с помощью ИФА. NK-клетки выделяли из РВМС здоровых доноров и культивировали в присутствии ATX-130 с неактивным Fc IgG1 мыши (mATX-130), изотипическим контролем IgG1-KIF человека, ATX-130 (hATX-130) и только в среде. Через 24 часа инкубации собирали супернатанты клеточных культур и проводили ИФА для обнаружения секретированного IFN-гамма. Концентрация ATX-130 (10

мкг/мл, 5 мкг/мл, 1 мкг/мл или среда) указана в верхней части каждого столбца и соответствует концентрациям, указанным в условных обозначениях фигуры.

[046] **На фиг. 15** показаны результаты конкурентных анализов, выполненных для оценки антитела АТХ-130 к CD94. Для всех конкурентных анализов АТХ-130 инкубировали с РВМС в концентрации 7,5 мкг/мл. Коммерчески доступные антитела к CD94 (клоны НР-3D9, DX22, 131412, 12K45 и НР-3В1) титровали и инкубировали с РВМС одновременно с АТХ-130. Конкурирование оценивали путем построения графика MFI титрованных коммерчески доступных антител к CD94. АТХ-130 не конкурирует с НР-3D9, DX22, 131412, 12K45 или НР-3В1.

[047] **На фиг. 16** показаны результаты анализов блокирования тетрамера HLA-E, проведенных с использованием АТХ-130-KIF и контрольного изотипического антитела с использованием проточной цитометрии. РВМС здоровых доноров инкубировали с АТХ-130-KIF. Затем тетрамер HLA-E, меченный PE, инкубировали со смесью клеток и антител и определяли с помощью проточной цитометрии. В этом анализе использовали насыщающие концентрации АТХ-130-KIF. Процент блокировки рассчитывали как  $100 - ((\text{процент положительных результатов HLA-E для антитела к CD94}) / (\text{процент положительных результатов HLA-E для изотипа})) * 100$ . Стрелками указаны АТХ-130-KIF и гистограммы изотипов. АТХ-130-KIF не блокировало связывание HLA-E с CD94.

[048] **На фиг. 17** показаны результаты анализа интернализации антитела к CD94. РВМС здорового донора инкубировали с неконъюгированными АТХ-130 в различные моменты времени в диапазоне от 30 минут до 24 часов. Клетки хранили либо при 4°C для предотвращения интернализации, либо при 37°C для индуцирования интернализации. АТХ-130 существенно не интернализируется в течение 24 часов.

[049] **На фиг. 18** показано связывание АТХ-130-KIF с типами иммунных клеток, измеренное с помощью проточной цитометрии. Типы иммунных клеток (моноциты, CD4 Т-клетки, В-клетки, CD8 Т-клетки и NK-клетки) РВМС из образцов здорового донора, яванского макака и пациентов с лейкозом LGL окрашивали АТХ-130-KIF Alexa Fluor 647 (50 нМ) и оценивали на предмет связывания. АТХ-130-KIF избирательно связывается с NK-клетками (CD3-CD56+/CD16+), субпопуляцией нормальных CD8 Т-клеток (CD3+CD8+) и всеми клетками LGLL (CD3-CD16+). Стрелками указаны АТХ-130-KIF и гистограммы изотипов.

[050] **На фиг. 19** показаны результаты анализа ADCC для АТХ-130-KIF с использованием РВМС здоровых доноров. РВМС здоровых доноров высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с АТХ-130 (титровали в 10-кратных разведениях) в течение 24 часов. Истощение различных типов иммунных клеток оценивали путем количественного определения оставшегося количества клеток с помощью проточной цитометрии. Стрелками указаны АТХ-130-KIF и кривые изотипов. АТХ-130 истощает NK-клетки человека с активностью 0,8 нг/мл, сохраняя при этом другие типы иммунных клеток.

[051] **На фиг. 20** показаны результаты анализа ADCC антитела к CD94 с

использованием РВМС яванского макака. РВМС яванского макака высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с АТХ-130-KIF (титрованным в 10-кратных разведениях) в течение 24 часов. Истощение различных типов иммунных клеток (NK-клеток, CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток и В-клеток) оценивали путем количественного определения оставшегося количества клеток с помощью проточной цитометрии. Стрелками указаны АТХ-130-KIF и кривые изотипов. АТХ-130-KIF истощает NK-клетки яванского макака с активностью 0,3 нг/мл, сохраняя при этом другие типы иммунных клеток.

[052] **На фиг. 21** показаны результаты анализа ADCC антитела к CD94 с использованием РВМС T-LGLL и CLPD-NK. РВМС T-LGLL и CLPD-NK высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с АТХ-130-KIF (титрованным в 10-кратных разведениях) в течение 24 часов. Истощение различных типов иммунных клеток оценивали путем количественного определения оставшегося количества клеток с помощью проточной цитометрии. Стрелками указаны АТХ-130-KIF и кривые изотипов. АТХ-130-KIF истощает клетки T-LGLL и CLPD-NK с активностью 0,2 и 0,6 нг/мл соответственно, сохраняя при этом другие типы иммунных клеток.

[053] **На фиг. 22А** показана схема исследования по изучению эффектов АТК-130 или изотипического контроля на гуманизированных IL-15-трансгенных мышах, которым трансплантировали РВМС здорового человека-донора.

[054] **На фиг. 22В** показано истощение здоровых человеческих NK-клеток и CD8 Т-клеток у трансгенных по IL-15 мышей. Мышам прививали РВМС здорового донора в течение трех дней. Одну дозу изотипического контроля IgG1 человека или АТХ-130 (5 мг/кг) вводили мышам (по 5 мышей на руку) и истощение NK-клеток (верхняя панель) и CD8 Т-клеток (нижняя панель) в крови, селезенке и костном мозге оценивали с помощью проточной цитометрии через 48 часов после введения дозы. Истощение количественно определяли по количеству NK- и CD8-Т-клеток, оставшихся в соответствующих образцах.

[055] **На фиг. 23** показано истощение клеток LGLL в крови, селезенке, костном мозге и печени у трансгенных по IL-15 мышей. Мышам прививают LGLL РВМС в течение 28 дней. Одну дозу человеческого изотипического контроля IgG1 или АТХ-130 (5 мг/кг) вводили мышам (по 5 мышей на руку), и с помощью проточной цитометрии оценивали истощение клеток LGLL в крови, селезенке, костном мозге и печени через 48 часов после введения дозы. Истощение количественно определяли по количеству CD94+ LGLL клеток, оставшихся в соответствующих образцах.

[056] **На фиг. 24А** показана схема исследовательского фармакодинамического (PD) исследования на приматах, отличных от человека, для оценки эффективности АТК-130 *in vivo*.

[057] **На фиг. 24В** показано истощение NK-клеток яванского макака *in vivo* при дозе АТХ-130-KIF 2 мг/кг, как оценено с помощью проточной цитометрии. Двум интактным яванским макакам (Супо №1 и Супо №2) вводили АТХ-130-KIF (2 мг/кг) посредством внутривенной (в/в) инфузии в течение 60 минут. Дополнительные 2 мг/кг

АТХ-130-KIF вводили яванскому макаку 1 в 8 недель и яванскому макаку 2 в 16 недель. Массу тела и клинические наблюдения периодически регистрировали. РВМС выделяли из 5 мл крови, взятой на момент времени на животное.  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования CD3-CD8+ использовалась для идентификации NK-клеток яванского макака. NK-клетки определяли количественно, вычисляя процент клеточной популяции от общего количества РВМС. Стрелки указывают моменты времени, в которые вводили дозы.

[058] На **фиг. 25А-25В** показана оценка истощения CD4 T-, CD8 T- и В-клеток яванского макака. РВМС выделяли из 5 мл крови, взятой в момент времени для яванского макака 1 и яванского макака 2.  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегию гейтирования CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD3-CD20+ использовали для идентификации CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и В-клеток яванского макака 1 (**фиг. 25А**) и яванского макака 2 (**фиг. 25В**) соответственно. Клетки определяли количественно, вычисляя процент клеточной популяции от общего количества РВМС.

[059] На **фиг. 26** показаны результаты оценки истощения моноцитов с помощью проточной цитометрии. РВМС выделяли из 5 мл крови, взятой в момент времени для яванского макака 1 (левая панель) и яванского макака 2 (правая панель).  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования CD3-CD14+ использовалась для идентификации моноцитов. Клетки определяли количественно, вычисляя процент клеточной популяции от общего количества РВМС.

[060] На **фиг. 27** показаны результаты оценки экспрессии CD16 на моноцитах с помощью проточной цитометрии. РВМС выделяли из 5 мл крови, взятой в момент времени для яванского макака 1 (левая панель) и яванского макака 2 (правая панель).  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования CD3-CD14+ использовалась для идентификации моноцитов. CD16 MFI оценивали на моноцитах.

[061] На **фиг. 28А** показана схема исследования PD без GLP на приматах, отличных от человека, для оценки эффективности АТК-130 *in vivo*.

[062] На **фиг. 28В** показано истощение NK-клеток яванского макака *in vivo* при дозировании АТХ-130 5, 50 и 100 мг/кг. РВМС выделяли из 0,5 мл крови, взятой в момент времени на животное.  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования CD3-CD16+ использовалась для идентификации NK-клеток яванского макака. NK-клетки определяли количественно, вычисляя процент клеточной популяции от общего количества РВМС.

[063] На **фиг. 29** показано истощение CD94+CD8+NKG2A+ клеток яванского макака *in vivo* при дозировании АТХ-130 5, 50 и 100 мг/кг. РВМС выделяли из 0,5 мл крови, взятой в момент времени на животное.  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в трех технических повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования

CD3+CD8+NKG2A+ использовалась для идентификации CD8+ Т-клеток яванского макака. CD8 Т-клетки определяли количественно, вычисляя процент клеточной популяции от общего количества РВМС. Идентификаторы в верхней части каждого столбца указывают момент времени, когда были выделены РВМС, и соответствуют моментам времени, изображенным на условных обозначениях фигуры.

[064] На **фиг. 30** показано истощение NK-клеток и CD94+CD8+NKG2A+ Т-клеток яванского макака *in vivo* при дозировании АТХ-130 в дозах 5, 50 и 100 мг/кг или в качестве контроля носителя в дозе 0 мг/кг (с использованием забуференного фосфатом физиологического раствора Дульбекко, PBS). В конце исследования собирали двенадцатиперстную кишку, печень, селезенку и костный мозг. Ткани диссоциировали на суспензии отдельных клеток и  $0,3 \times 10^6$  клеток высевали на лунку в технических трех повторностях и окрашивали панелью антител. Стратегия гейтирования CD3+CD8+NKG2A+ использовалась для идентификации CD8+ Т-клеток яванского макака. Маркеры CD45+CD3-NKG2A+ использовали для идентификации NK-клеток яванского макака. Идентификаторы в верхней части каждой диаграммы указывают на антитела, использованные в эксперименте.

[065] На **фиг. 31А и 31В** показано связывание изображенных антител к CD94 с нормальными человеческими NK-клетками (**фиг. 31А**) или клетками НЕК293, экспрессирующими CD94 яванского макака (**фиг. 31В**). Антитела показаны номерами АТХ. Результаты показали, что антитела АТХ-# к CD94 связывались с NK-клетками человека или клетками, экспрессирующими CD94 яванского макака.

[066] На **фиг. 32А-32І** показаны результаты анализов блокирования тетрамера HLA-E для определения того, блокируют ли указанные антитела к CD94 связывание HLA-E. РВМС здоровых доноров инкубировали с антителами к CD94. Затем тетрамер HLA-E, меченный PE, инкубировали со смесью клеток и антител и определяли с помощью проточной цитометрии.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[067] Несколько аспектов описаны ниже со ссылкой на примеры применения для иллюстрации. Следует понимать, что многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы изложены для обеспечения полного понимания признаков, описанных в данном документе. Однако специалисту в соответствующей области техники будет легко понять, что описанные в данном документе признаки можно реализовать на практике без одной или нескольких конкретных деталей или с помощью других способов. Описанные в данном документе признаки не ограничены проиллюстрированным порядком действий или событий, поскольку некоторые действия могут происходить в разном порядке и/или одновременно с другими действиями или событиями. Кроме того, не все проиллюстрированные действия или события требуются для реализации методологии в соответствии с описанными в данном документе функциями.

[068] Используемые в данном документе формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если в контексте явно

не указано иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включая», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используются либо в подробном описании, либо в формуле изобретения, такие термины предназначены для включительно аналогично термину «содержащий». Используемый в данном документе термин «содержащий» является синонимом слов «включающий» или «вмещающий» и является включающим или открытым.

[069] Любая ссылка на «или» в данном документе подразумевает охват «и/или», если не указано иное. Используемый в данном документе термин «около» в отношении числа относится к этому числу плюс или минус 10% от этого числа. Термин «приблизительно» по отношению к диапазону относится к этому диапазону минус 10% от его наименьшего значения и плюс 10% от его наибольшего значения.

### *I. Антитела*

[070] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены антитела, которые связываются с CD94, например, с CD94 человека, экспрессированным на поверхности NK-клеток или T-клеток. В настоящем документе также представлены антитела, которые связываются с CD94 и имеют Fc-часть иммуноглобулина с модификациями, включая пониженное фукозилирование, отсутствие фукозилирования или мутации, которые усиливают активность ADCC и/или улучшают аффинность Fc-области к Fc-рецепторам, таким как CD16 (например, CD16a). В настоящем документе также предусмотрены антитела, которые связываются с CD94 и обладают одной или несколькими из следующих характеристик: связываются с CD94 человека и CD94 яванского макака, не блокируют связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеют низкую степень направленности (например, CD94), не являются фукозилированными или имеют сниженное фукозилирование и/или индуцируют или стимулируют активность ADCC.

### *A. Мишени антител и аффинности*

[071] В некоторых вариантах осуществления антитела, предусмотренные в настоящем документе, связываются с CD94. В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, связываются с CD94 человека (*например*, внеклеточный домен CD94 человека). В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, связываются с CD94 яванского макака (*например*, внеклеточный домен CD94 яванского макака). В некоторых вариантах осуществления антитела, предусмотренные в настоящем документе, связываются с CD94 человека и с CD94 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с CD94 на поверхности NK-клеток и/или T-клеток.

[072] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с человеческим белком CD94 или его частью, или белком, имеющим по меньшей мере 80% (например, любое из по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) гомологию с белком CD94 человека или его

частью. Аминокислотные последовательности иллюстративных белков CD94 человека представлены в виде последовательностей SEQ ID NO: 25-27:

MAVFKTTLWRLISGTLGIICLSLMSTLGILLKNSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKSDSC  
CS

CQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNEsrHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQF  
YWIGLS

YSEEHTAWLWENGsALSQYLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYIC  
KQQLI (SEQ ID NO: 25)

MAVFKTTLWRLISGTLGIICLSLMSTLGILLKNSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKSDSC  
CS

CQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNEsrHLCASQKSSLLQLQNTDELQDFMSSSQF  
FYWIGL

SYSEEHTAWLWENGsALSQYLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYIC  
KQQLI (SEQ ID NO: 26)

MAAFTKLSIEPAFTPGPNIELQKSDCCSCQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNEsr  
HLCAS

QKSSLLQLQNTDELDFMSSSQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGsALSQYLFPSFET  
FNTKN

CIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI  
SYSEEHTAWLWENGsALSQYLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQL  
I (SEQ ID NO: 27)

[073] В некоторых вариантах осуществления термины связываются, специфически связываются или специфичны для обозначения измеримых и воспроизводимых взаимодействий, таких как связывание между мишенью и антителом, которое определяет присутствие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое связывается или специфически связывается с мишенью (которая может быть эпитопом), представляет собой антитело, которое связывает эту мишень с большей аффинностью, авидностью, большей готовностью и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями. В одном варианте осуществления степень связывания антитела с неродственной мишенью составляет менее примерно 10% от связывания антитела с мишенью, измеренной, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с мишенью, имеет константу диссоциации ( $K_D$ )  $< 1$  мкМ,  $< 100$  нМ,  $< 10$  нМ,  $< 1$  нМ или  $< 0,1$  нМ. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с эпитопом на белке, который является консервативным среди белков разных видов. В другом варианте осуществления специфическое связывание может включать эксклюзивное связывание, но не обязательно.

[074] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем документе, связываются с CD94 человека (антиген естественных клеток-

киллеров CD94; CD94 Entrez Gene ID: 3824; KLRD1 (символ HGNC); идентификатор UniProtKB: Q13241; HGNC: 6378; Ensembl: ENSG00000134539 OMIM: 602894; KP43).

[075] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с белком CD94 яванского макака или его частью, или белком, имеющим по меньшей мере 80% (например, любое из по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) гомологию с белком CD94 яванского макака или его частью. Аминокислотные последовательности белков CD94 яванского макака известны в данной области техники, например, идентификатор UniProtKB: Q68VD4.

[076] В определенных вариантах осуществления аффинность антитела к его мишени (например, CD94) может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области техники, такими как проточная цитометрия или вестерн-блоттинг, а также с использованием анализов, описанных в настоящем документе (например, в примерах). В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  измеряют с помощью анализа связывания антигена с радиоактивной меткой (RIA), проводимого с Fab-версией антитела по изобретению и его мишенью (например, CD94). В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса. Примеры анализов описаны, *например*, в Drake, A.W. and Klakamp, S.L. (2007) J. Immunol. Methods 318:147-152.

[077] В некоторых вариантах осуществления связывание антитела по настоящему изобретению с CD94, например, CD94 человека и/или CD94 яванского макака, можно оценить с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, связывание антитела по настоящему изобретению с CD94 человека можно оценить в анализе на основе проточной цитометрии *ex vivo* с использованием моноклеарных клеток периферической крови (PMBC) и/или NK-клеток, например, как описано в примерах. Кривые титрования и EC50 могут быть получены и оценены с использованием методов, известных в данной области техники, таких как использование призмы Graphpad. В другом примере связывание антитела по настоящему изобретению с CD94 яванского макака можно оценить в анализе на основе проточной цитометрии *ex vivo* или *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих CD94 яванского макака, таких как клетки HEK293, экспрессирующие CD94 яванского макака, например, как описано в примерах.

[078] В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  менее приблизительно 10 мкМ для связывания со своей мишенью (например, CD94 человека и/или яванского макака). В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  менее приблизительно 1 мкМ для связывания со своей мишенью (например, CD94 человека и/или яванского макака). В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  любое из менее чем приблизительно 1000 нМ, менее чем приблизительно 900 нМ, менее чем приблизительно 800 нМ, менее



клетках человека.

[080] В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 90 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 70 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ или менее чем приблизительно 0,1 нМ для связывания с CD94 яванского макака на клетках, экспрессирующих CD94 яванского макака. В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  менее чем приблизительно 75 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 70 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ или менее чем приблизительно 0,1 нМ для связывания с CD94 яванского макака на клетках, экспрессирующих CD94 яванского макака. В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет  $K_D$  от около 2 нМ до около 80 нМ для связывания с CD94 яванского макака на клетках, экспрессирующих CD94 яванского макака.

[081] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается со своей мишенью (например, CD94) в том же или другом эпитопе, что и антитело, известное в данной области техники для этой мишени. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с другим эпитопом в качестве антитела, известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело не связывается с тем же эпитопом на CD94 человека, что и клоны антител CD94 к HP-3D9, DX22, HP-3B1, 131412 или 12K45. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело не связывается с тем же эпитопом на CD94 человека, что и клоны антител к CD94 DX22, HP-3B1 или 131412. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело связывается с тем же эпитопом на CD94 человека, что и клоны антител к CD94 HP-3D9, DX22, HP-3B1, 131412 или 12K45. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело связывается с тем же

эпитопом на человеческом CD94, что и клон антитела к CD94 HP-3D9. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело связывается с тем же эпитопом на человеческом CD94, что и клон антитела к CD94 12K45.

[082] В некоторых вариантах осуществления, если антитело по настоящему изобретению не связывается со своей мишенью (например, CD94) в том же эпитопе, что и другое антитело для этой мишени, например, коммерчески доступное антитело или известное в данной области техники антитело для этой мишени, тогда антитело по изобретению не блокирует связывание другого антитела с мишенью в конкурентном анализе (например, как описано в примерах), например, на 50% или более.

[083] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается со своей мишенью (например, CD94) с более высокой аффинностью, чем известное в данной области техники антитело для этой мишени. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается со своей мишенью (например, CD94) с более высокой аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3D9, DX22, HP-3B1, 131412 или 12K45. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается со своей мишенью (например, CD94) с более высокой аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3B1, 131412 или 12K45.

[084] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело связывается с CD94 человека с большей аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3D9, DX22, HP-3B1, 131412 или 12K45. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело связывается с CD94 человека с большей аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3B1, 131412 или 12K45.

[085] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается со своей мишенью (например, CD94) с любой из по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 2,5 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 3,5 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 4,5 раза, по меньшей мере 5 раза, по меньшей мере 5,5 раза, по меньшей мере 6 раза, по меньшей мере 6,5 раза, по меньшей мере 7 раза, по меньшей мере 7,5 раза, по меньшей мере 8 раза, по меньшей мере 8,5 раза, по меньшей мере 9 раза, по меньшей мере 9,5 раза, по меньшей мере 10 раза или более большей аффинностью, чем другое антитело, известное в данной области техники, к этой мишени.

#### *В. Иллюстративные антитела к CD94*

[086] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%,







по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

[092] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

[093] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

[094] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%,



меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

[097] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три

аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

[098] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

[099] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности



этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35.

[0103] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0104] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:65, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66.



92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35.

[0107] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:37, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:38; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35.

[0108] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0109] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере



или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:40; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35.

[0112] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:40; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID





содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:43; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:44, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:46.

[0118] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[0119] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72.

[0120] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит



мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52.

[0122] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52.

[0123] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[0124] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере



ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:56.

[0127] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:56.





последовательности SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61.

[0133] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:77, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:78.

[0135] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при



идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61.

[0137] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61.

[0138] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0139] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по



последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:64.

[0142] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:62; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:64.

[0143] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит





NO:102, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0153] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:108, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0154] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:109, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:110, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

[0155] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, перечисленные в таблице 1, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, перечисленные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит домен VH и/или VL одного антитела, указанного в таблице 2.

**Таблица 1.** Последовательности CDR антитела к CD94

<i>Название</i>	<b>CDR-H1</b>	<b>CDR-H2</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>CDR-L3</b>
18H3	SYWIG (SEQ ID NO:1)	IIYPGDS DTRYSP SFQG (SEQ ID NO:2)	PFDYGGG PGYFDY (SEQ ID NO:3)	RASQSIR SWLA (SEQ ID NO:4)	KASSLES (SEQ ID NO:5)	QQYNTFW T (SEQ ID NO:6)
1M4	NYAMN (SEQ ID NO:7)	VISGSGD TTYCAD SVKG (SEQ ID NO:8)	NCYGSGS YYNHFDY (SEQ ID NO:9)	KSSQSV LYSSNR MNYLA (SEQ ID NO:10)	WASTRES (SEQ ID NO:11)	QQYYSIPL T (SEQ ID NO:12)
1E4	TSDLCV	LIDWND	TIAAAGP	KSSQSV	WASTRKS	QEYYSLRF

	S (SEQ ID NO:13)	DKYYST SLQT (SEQ ID NO:14)	YDAFDI (SEQ ID NO:15)	LYGSNN KNYLA (SEQ ID NO:16)	(SEQ ID NO:17)	T (SEQ ID NO:18)
ATX-122 (Kabat)	SYGVS (SEQ ID NO: 30)	WISPYN GNTNYA HNLQG (SEQ ID NO: 31)	DRGRFGE LFFDY (SEQ ID NO: 32)	RASQGIS NYLA (SEQ ID NO: 33)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-122 (IMGT)	GYTFTS YG (SEQ ID NO: 87)	ISPYNGN T (SEQ ID NO: 88)	ARDRGRF GELFFDY (SEQ ID NO: 89)	QGISNY (SEQ ID NO: 90)	AAS (SEQ ID NO: 91)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-123 (Kabat)	SYGIS (SEQ ID NO: 36)	WISAYN GNTNYA QKFQG (SEQ ID NO: 37)	DRGRFGE LLSDY (SEQ ID NO: 38)	RASQGIS NYLA (SEQ ID NO: 33)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-123 (IMGT)	GYTFTS YG (SEQ ID NO: 87)	ISAYNG NT (SEQ ID NO: 92)	ARDRGRF GELLSDY (SEQ ID NO: 93)	QGISNY (SEQ ID NO: 90)	AAS (SEQ ID NO: 91)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-124 (Kabat)	SYGIS (SEQ ID NO: 36)	WISAYN GNTNYA QKLQG (SEQ ID NO: 39)	DRGRFGE LFFDH (SEQ ID NO: 40)	RASQGIS NYLA (SEQ ID NO: 33)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-124 (IMGT)	GYTFTS YG (SEQ ID NO: 87)	ISAYNG NT (SEQ ID NO: 92)	ARDRGRF GELFFDH (SEQ ID NO: 94)	QGISNY (SEQ ID NO: 90)	AAS (SEQ ID NO: 91)	LQHNSYPF T (SEQ ID NO: 35)
ATX-125 (Kabat)	SIYYW G (SEQ ID NO:	SIYYSGS TYYNPS LKS	LPLTGEFA FDI (SEQ ID NO: 43)	RASQSV STYLA (SEQ ID	GASSRAT (SEQ ID NO: 45)	QQYGSSPI T (SEQ ID NO: 46)

	41)	(SEQ ID NO: 42)		NO: 44)		
ATX-125 (IMGT)	GGSISSI IYY (SEQ ID NO: 95)	IYYSGST (SEQ ID NO: 96)	ARLPLTG EFAFDI (SEQ ID NO: 97)	QSVSTY (SEQ ID NO: 98)	GAS (SEQ ID NO: 99)	QQYGSSPI T (SEQ ID NO: 100)
ATX-126 (Kabat)	SYSMN (SEQ ID NO: 47)	SISTSSN FIYYADS VKG (SEQ ID NO: 48)	DMGPFYS FYYMDV (SEQ ID NO: 49)	RASQSV SSSYLA (SEQ ID NO: 50)	GASNRAT (SEQ ID NO: 51)	LQHNSYPP T (SEQ ID NO: 52)
ATX-126 (IMGT)	GFTFSS YS (SEQ ID NO: 109)	ISTSSNFI (SEQ ID NO: 110)	VRDMGPF YSFYMD V (SEQ ID NO: 114)	QSVSSS Y (SEQ ID NO: 115)	GAS (SEQ ID NO: 99)	LQHNSYPP T (SEQ ID NO: 52)
ATX-127 (Kabat)	SRYWW T (SEQ ID NO: 53)	EIYHSGT TNYNPS LES (SEQ ID NO: 54)	SPNWGY YYYMDV (SEQ ID NO: 55)	RASQSV SSSYLA (SEQ ID NO: 50)	GASSRAT (SEQ ID NO: 45)	QQYGRSLT (SEQ ID NO: 56)
ATX-127 (IMGT)	GGSISS RYW (SEQ ID NO: 116)	IYHSGTT (SEQ ID NO: 117)	ARSPNWG YYYYYM DV (SEQ ID NO: 118)	QSVSSS Y (SEQ ID NO: 115)	GAS (SEQ ID NO: 99)	QQYGRSLT (SEQ ID NO: 56)
ATX-128 (Kabat)	GSTIQ (SEQ ID NO: 57)	RIRSKA NSYATA SAASVK G (SEQ ID NO: 58)	EGLGYN VGYYYFY MDV (SEQ ID NO: 59)	RASQSI SYLN (SEQ ID NO: 60)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	QQSYSTPIT (SEQ ID NO: 61)
ATX-128 (IMGT)	GFTFSG ST (SEQ ID NO:	IRSKANS YAT (SEQ ID	TREGLGY YNVGY FYMDV	QSISSY (SEQ ID NO: 104)	AAS (SEQ ID NO: 91)	QQSYSTPIT (SEQ ID NO: 61)

	101)	NO: 102)	(SEQ ID NO: 103)			
ATX-129 (Kabat)	SYWMS (SEQ ID NO: 83)	NIKQDG SAKYVYV DSVKG (SEQ ID NO: 84)	GYDFY (SEQ ID NO: 85)	RVSQGIS SYLN (SEQ ID NO: 86)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	QQSYSTPIT (SEQ ID NO: 61)
ATX-129 (IMGT)	GFTFSS YW (SEQ ID NO: 105)	IKQDGS AK (SEQ ID NO: 106)	ARGYYFD Y (SEQ ID NO: 107)	QGISSY (SEQ ID NO: 108)	AAS (SEQ ID NO: 91)	QQSYSTPIT (SEQ ID NO: 61)
ATX-130 (Kabat)	SYSMN (SEQ ID NO: 47)	SISTSSN FIYYADS VKG (SEQ ID NO: 48)	DLGRYYY YMDV (SEQ ID NO: 62)	RASQGIS SWLA (SEQ ID NO: 63)	AASSLQS (SEQ ID NO: 34)	QKYNSAPF T (SEQ ID NO: 64)
ATX-130 (IMGT)	GFTFSS YS (SEQ ID NO:109)	ISTSSNFI (SEQ ID NO: 110)	ARLDGRY YYYMDV (SEQ ID NO: 111)	QSISSW (SEQ ID NO: 112)	ASS (SEQ ID NO: 113)	QKYNSAPF T (SEQ ID NO: 64)

**Таблица 2.** Последовательности переменных доменов антитела к CD94

<i>Название</i>	<b>VH</b>	<b>VL</b>
18H3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIPGDS DTRYSPSFQGGQVI ISADKSITTAFLQWSSLKASDTAM YYCARPFDYGGSPGYFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRA SQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYNTFWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:20)
1M4	QLVESGGGLVQPGGSLRLACAAS GFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEW VSVISGSGDTTYCADSVKGRFTIS RDNSKNTLHLQLNSLRAEDTAVY YCAKNCYGSGSYNHFYDWGQG TLVTVSS	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS SQSVLYSSNRMNYLAWYQQKPGQ PPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSIPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

	(SEQ ID NO:21)	
1E4	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTF SGFSLSTSDLCVSWIRQPPGKALE WLALIDWNDDKYYSTSLQTRLTI SKDTSKNQVVLTMNMDPVDTA TYYCARTIAAAGPYDAFDIWGQG TMVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCKSS QSVLYGSNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYWASTRKSQVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQEYYS LRFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:24)
ATX-122	QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSC ASGYTFTSYGVSQVRQAPGQGLE WVGWISPYNGNTNYAHNLQGRV AMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDM AVYYCARDRGRFGELFFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA SQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQHNSYPFTFGP GTKVDIK (SEQ ID NO: 66)
ATX-123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKFQGR VTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDRGRFGELLSYDWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67)	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA SQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQHNSYPFTFGP GTKVDIK (SEQ ID NO: 68)
ATX-124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMEVRSRSLRSDD TAVYYCARDRGRFGELFFDHWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA SQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQHNSYPFTFGP GTKVDIK (SEQ ID NO: 70)
ATX-125	QVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTV SGGSISSIIYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYY CARLPLTGEFAFDIWGQGMVTV SS (SEQ ID NO: 71)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSTYLAWFQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGGSPITFGQG TRLEIK (SEQ ID NO: 72)
ATX-126	QVQLQESGGGLVQPGGSLKLSA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISTSSNFIYYADSVKGRFTIS	DIQVTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI

	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRDMGPFYSFYMDVWGN GTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)	SSLQPEDFATYYCLQHNSYPPTFGG GTKVDIK (SEQ ID NO: 74)
ATX-127	QVQLQQSGPGLVKPSGTLSTCA VSGGSISSRYWWTWVRQPPGKGL EWIGEIYHSGTTNYPNPSLESRTIS VDKSKNQFSLKVSSVTAADTAVY YCARSPNWGYYYYYMDVWGKG TTVTVSS (SEQ ID NO: 75)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLESEDFAVYYCQQYGRSLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 76)
ATX-128	QVQLQESGGGLVQPGGSLKLSA ASGFTFSGSTIQWVRQASGKGLE WVGRIRSKANSYATASAASVKGR FTISRDDSKNMAYLQMNSLKTED TAVYYCTREGLGYYNVGYYYFY MDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 77)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQG TRLEIK (SEQ ID NO: 78)
ATX-129	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL EWMANIKQDGS AKYYVDSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYYFDYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 79)	EIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRVS QGISSYLNWYRQKPGKVPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQG TRLEIK (SEQ ID NO: 80)
ATX-130	EVQLLES GGGLVKPGGSLRLS ASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLE WVSSISTSSNFIYYADSVKGRFTIS RNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDLGRYYYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO: 81)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKSLIYA ASSLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQKYNAPFTFGP GTKVDIK (SEQ ID NO: 82)

[0156] Многие определения последовательностей CDR переменного домена антитела известны в данной области техники и могут быть использованы для описания антител по настоящему изобретению, *например*, с помощью последовательностей CDR. В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR антител определены как в Kabat (*см.*, *например*, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR антител определены как в Chothia (*см.*, *например*, Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах

осуществления последовательности CDR антител определены как в IMGT (*см., например, Lefranc, M.P. (1999) The Immunologist 7:132-136*). В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR одного антитела определяются как смешивание двух или более определений, *например, Kabat, Chothia, и/или IMGT*. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66. В некоторых вариантах осуществления Антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VH ATX-122, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*), и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VL ATX-122, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*). В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления Антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VH ATX-123, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*), и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VL ATX-123, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*). В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления Антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VH ATX-124, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*), и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VL ATX-124, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*). В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления антитело по



или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:80. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VH ATX-129, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*), и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VL ATX-129, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*). В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81, и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 CDR, или последовательности HVR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82. В некоторых вариантах осуществления Антитело по настоящему изобретению содержит домен VH, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VH ATX-130, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*), и/или домен VL, содержащий 1, 2 или все 3 последовательности CDR или HVR, присутствующие в последовательности домена VL ATX-130, как описано в настоящем документе (*см., например, таблицу 2*).

[0157] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

[0158] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

[0159] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

[0160] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариательный домен тяжелой цепи (VH) и вариательный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

[0161] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариательный домен тяжелой цепи (VH) и вариательный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

[0162] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариательный домен тяжелой цепи (VH) и вариательный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

[0163] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариательный домен тяжелой цепи (VH) и вариательный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0164] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариательный домен тяжелой цепи (VH) и вариательный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

[0165] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0166] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68.

[0167] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0168] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70.

[0169] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[0170] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

[0171] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[0172] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

[0173] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56.

[0174] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

[0175] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0176] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78.

[0177] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0178] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80.

[0179] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

[0180] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с эпитопом на CD94 человека или яванского макака, который является таким же, как эпитоп CD94, связанный антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82.

[0181] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

[0182] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

[0183] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

[0184] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

[0185] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

[0186] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

[0187] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0188] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

[0189] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0190] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68.

[0191] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[0192] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70.

[0193] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[0194] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

[0195] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[0196] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариabельный домен тяжелой цепи (VH) и вариabельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

[0197] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариabельный домен тяжелой цепи (VH) и вариabельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56.

[0198] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариabельный домен тяжелой цепи (VH) и вариabельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

[0199] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариabельный домен тяжелой цепи (VH) и вариabельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0200] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариabельный домен тяжелой цепи (VH) и вариabельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78.

[0201] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

[0202] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80.

[0203] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

[0204] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению конкурирует за связывание с CD94 человека или яванского макака с антителом к CD94, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82.

[0205] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит нефукозилированную Fc-область человека. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческим клеточным Fc-гамма-рецептором IIIA в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клетки, экспрессирующей CD94 человека на своей поверхности.

[0206] В некоторых вариантах осуществления термин антитело используется в

самом широком смысле и охватывает различные структуры антитела, включая, помимо прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, если они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой выделенное антитело. «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или выделено из компонента его естественной среды. Загрязняющие компоненты его естественной среды - это материалы, которые могут мешать исследовательскому, диагностическому и/или терапевтическому использованию антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено (1) до более чем 95% по весу антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более чем 99% по весу; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием, например, секвенатора с вращающейся чашкой, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием, например, синего или серебристого красителя Кумасси. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело получают по меньшей мере на одном этапе очистки.

[0207] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител, *т. е.* отдельные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающие при продуцировании препарата моноклонального антитела, такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело получают из по существу гомогенной популяции антител. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методами, включая, помимо прочего, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих полностью или частично локусы иммуноглобулинов человека.

#### С. Блокирование связывания HLA-E

[0208] Главный комплекс гистосовместимости класса I, E (HLA-E) является

лигандом гетеродимера CD94/NKG2A и играет решающую роль в ингибировании активности NK-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток при связывании с гетеродимером CD94/NKG2A. Таким образом, без привязки к теории, блокирование взаимодействия HLA-E и CD94/NKG2A может привести к активации и пролиферации клеток-мишеней, например, клеток, экспрессирующих CD94. Таким образом, может быть полезным, чтобы антитело к CD94 не блокировало взаимодействие HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, например, у субъекта с NK/Т-клеточной лимфомой, которому вводили антитело к CD94. В некоторых вариантах осуществления HLA-E представляет собой человеческий HLA-E, также известный как QA1 и HLA-6.2. Пример гена HLA-E *см., например*, в NCBI ген ID № 3133; пример полипептида HLA-E *см., например*, в NP\_005507.3.

[0209] В некоторых вариантах осуществления блокирование связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A относится к блокированию связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, блокированию связывания HLA-E с CD94 и/или блокированию связывания HLA-E с NKG2A.

[0210] Блокирование связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A антителом по настоящему изобретению можно оценить с помощью любого метода, известного в данной области техники. Например, блокирование связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A антителом по настоящему изобретению можно оценить с помощью анализа *ex vivo* с использованием РВМС и/или NK-клеток, например, как описано в примерах. В иллюстративном анализе РВМС, например, полученные от здоровых доноров, инкубируют с Fc-блоком человека (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния) и красителем для определения жизнеспособности клеток (Thermo Fisher, Карлсбад, Калифорния) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки однократно промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG низким FBS). Антитела к CD94 или изотипические контрольные антитела в насыщающих концентрациях инкубируют с клетками в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки промывали и инкубировали с тетрамером HLA-E PE (Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк), тихоокеанским голубым CD3 и антителами к CD56 FITC (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки окончательно промывали буфером FACS перед количественным определением на проточном цитометре. Сбор данных и компенсация флуоресценции могут быть выполнены с использованием способов, известных в данной области техники, таких как использование проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, Часка, Миннесота). Анализ данных может быть выполнен с использованием любого метода, известного в данной области техники, например, с использованием программного обеспечения FlowJo. NK-клетки идентифицировали путем гейтирования лимфоцитов при прямом и боковом рассеянии с последующим исключением дублетов и мертвых клеток и гейтированием популяции CD3-CD56<sup>+</sup>. Затем определяют количество HLA-E в популяции CD3-CD56<sup>+</sup> NK-клеток. Процент блокирования связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A антителом к CD94 по сравнению с контрольным антителом, например, контрольным изотипическим антителом, рассчитывается как:  $100 - ((\text{процент}$

положительных результатов HLA-E на антитело к CD94)/(процент положительных результатов HLA-E на изотип)\*100).

[0211] В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, если оно блокирует более чем примерно 20% связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, например, по сравнению с контрольным изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, если оно блокирует приблизительно 21%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 99% или 100% связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, например, по сравнению с контрольным антителом, например, контрольным изотипическим

[0212] В некоторых вариантах осуществления антитело не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, если оно блокирует около 20% или менее связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, например, по сравнению с контрольным изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, если оно блокирует приблизительно 20%, приблизительно 18%, приблизительно 16%, приблизительно 14%, приблизительно 12%, приблизительно 10%, приблизительно 8%, приблизительно 6%, приблизительно 4%, приблизительно 2%, приблизительно 1%, приблизительно 0,5% или 0% связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, например, по сравнению с контрольным антителом, например, контрольным изотипическим антителом.

[0213] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению блокирует около 20% или менее, около 19% или менее, около 18% или менее, около 17% или менее, около 16% или менее, около 15% или менее, около 14% или менее, около 13% или менее, около 12% или менее, около 11% или менее, около 10% или менее, около 9% или менее, около 8% или менее, около 6% или менее, около 5% или менее, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1% или менее, около 0,5% или менее или 0% связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A по сравнению с контрольным антителом, например, изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, блокирует 0% связывания HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A по сравнению с контрольным антителом, например, изотипическим контрольным антителом.

#### *D. Улучшенная активность ADCC*

[0214] В некоторых вариантах осуществления антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимая клеточная цитотоксичность,

антителонаправленная клеточная цитотоксичность или ADCC относятся к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, продуцирующие Fc-рецепторы, например, естественные клетки-киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги, распознают антитело, связанное с клеткой-мишенью, и затем вызывают лизис клетки-мишени. Первичными медиаторными клетками являются естественные клетки-киллеры (NK). NK-клетки экспрессируют Fc $\gamma$ RIII (Ravetch et al. (1991) Annu. Rev. Immunol., 9:457-92). В некоторых вариантах осуществления активность ADCC относится к способности антитела или слитого белка Fc вызывать ADCC-реакцию.

[0215] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, обладают повышенной активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления усиленная активность ADCC относится к антителу или Fc-области антитела, опосредующей или индуцирующей ADCC более эффективно и/или более эффективно, чем нативное антитело или антитело дикого типа и/или нативная или дикая Fc-область антитела в присутствии эффектора клетки *in vitro* или *in vivo*, которые можно определить с помощью анализа ADCC, например, как описано в настоящем документе или как это общеизвестно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки представляют собой лейкоциты, которые продуцируют один или несколько Fc-рецепторов и выполняют эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления такие клетки продуцируют по меньшей мере Fc $\gamma$ RIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры ADCC-опосредованных лейкоцитов человека включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические T-клетки и нейтрофилы.

[0216] В некоторых вариантах осуществления активность ADCC можно оценить непосредственно с помощью анализа *in vitro*, используя анализ высвобождения <sup>51</sup>Cr с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и/или эффекторных клеток NK, *см., например*, Shields et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:6591-6604, или другого подходящего способа. Активность ADCC может быть выражена как количество оставшихся клеток после анализа ADCC или концентрация антитела или слитого Fc-белка, при которой лизис клеток-мишеней является полумаксимальным (например, EC50 или IC50). В некоторых вариантах осуществления активность ADCC определяют с помощью анализа *ex vivo* с использованием PBMC, LGL-клеток и/или NK-клеток, например, как описано в примерах, и активность ADCC антитела по настоящему изобретению описывают как процент клеток-мишеней, оставшихся после анализа ADCC и/или IC50 или EC50 антитела (*т.е.* концентрация антитела по настоящему изобретению, при которой достигается половина максимального истощения или лизиса клеток-мишеней). IC50 или EC50 антитела могут быть определены с использованием любого метода, известного в данной области техники, например, с использованием кривой дозировка-ответ и GraphPad Prism.

[0217] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе

антитела индуцируют активность ADCC с IC50 или EC50, измеренными с использованием анализа *ex vivo*, в диапазоне от около 1 нг/мл до около 100 нг/мл (например, любое из около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 10 нг/мл, около 15 нг/мл, около 20 нг/мл, около 25 нг/мл, около 30 нг/мл, около 35 нг/мл, около 40 нг/мл, около 45 нг/мл, около 50 нг/мл, около 55 нг/мл, около 60 нг/мл, около 65 нг/мл, около 70 нг/мл, около 75 нг/мл, около 80 нг/мл, около 85 нг/мл, около 90 нг/мл, около 95 нг/мл или около 100 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела индуцируют активность ADCC с IC50 или EC50, измеренными с использованием анализа *ex vivo*, около 20 нг/мл или менее. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела индуцируют активность ADCC с IC50 или EC50, измеренными с использованием анализа *ex vivo*, около 60 нг/мл или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению характеризуется IC50 или EC50, которое составляет по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% ниже, чем IC50 или EC50 контрольного антитела (например, контрольного антитела дикого типа или антитела, известного в данной области техники, или коммерчески доступного против той же мишени).

[0218] В некоторых вариантах осуществления IC50 или EC50 относятся к концентрации соединения (например, антитела), которая вызывает ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Например, IC50 или EC50 можно использовать для измерения способности антитела опосредовать и/или индуцировать эффекторную функцию, например активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления IC50 или EC50 кривой доза-ответ представляет собой концентрацию соединения (например, антитела), при которой наблюдается 50% его максимального эффекта.

[0219] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению характеризуется более высоким максимальным лизисом клеток-мишеней по сравнению с контрольным антителом (например, контрольным антителом дикого типа или антителом, известным в данной области техники, или коммерчески доступным против той же самой мишени). Например, антитела по настоящему изобретению могут демонстрировать максимальный лизис клеток-мишеней, который составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по

меньшей мере 100% выше контрольного антитела (например, контрольного антитела дикого типа или антитела, известного в данной области техники, или коммерчески доступного против той же мишени).

*(i) Улучшенное связывание с Fc-рецепторами*

[0220] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела включают Fc-область иммуноглобулина человека, которая обладает повышенной активностью ADCC по сравнению с Fc-областью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела связываются с человеческим клеточным Fc-рецептором в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор (FcR) представляет собой рецептор, который способен связываться с Fc-областью антитела. Определенные Fc-рецепторы могут связываться с IgG (т.е.  $\gamma$ -рецептором); такие рецепторы включают подклассы Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII, а также их аллельные варианты и события альтернативного сплайсинга. Обзор Fc-рецепторов см. Ravetch and China: Annu. Port. Immunol. 9, 457 (1991); Capel et al. Immunomethods, 4, 25 (1994); and de Haas et al., J. Leg. Clin. Med. 126, 330 (1995).

[0221] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе антитела связываются с человеческим клеточным Fc-гамма-рецептором IIIA в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клеточный Fc-гамма-рецептор IIIA человека содержит остаток валина или остаток фенилаланина в положении аминокислотного остатка 158. См., например, UniProt Accession P08637 или VAR\_003960. В некоторых вариантах осуществления клеточный Fc-гамма-рецептор IIIA человека содержит последовательность SEQ ID NO: 28 или 29.

Гамма-рецептор Fc клеток человека IIIA 158F

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA  
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPV  
QLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKY  
FHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNIITITQGLAVSTIS  
SFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKD  
PQDK(SEQ ID NO: 28)

Гамма-рецептор Fc клеток человека IIIA 158V

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA  
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPV  
QLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKY  
FHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNIITITQGLAVSTIS  
SFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKD  
PQDK(SEQ ID NO: 29)

[0222] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению относится к изотипу IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (IgA1 или IgA2), IgD, IgM или IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело,

представленное в настоящем документе, относится к изотипу IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, относится к изотипу IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело, предусмотренное в данном документе, связывается с человеческим клеточным Fc-гамма-рецептором IIIA (FcγRIIIA) в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клеточный Fc-гамма-рецептор IIIA человека содержит остаток валина или остаток фенилаланина в положении аминокислотного остатка 158. Типичные анализы для определения связывания с человеческим клеточным Fc-гамма-рецептором IIIA известны в данной области техники; см., например, Lazar, G.A. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. 103:4005-1010; and Ferrara, C. et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. 108:12669-12674.

[0223] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает нативную Fc-область или вариантную Fc-область. В одном варианте осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. В некоторых вариантах осуществления нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации ЕС, также называемой индексом ЕС, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. В некоторых вариантах осуществления Fc-область дикого типа или нативная Fc-область представляют собой Fc-область, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области представляет собой Fc-область, которая содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности или последовательности дикого типа Fc-области по меньшей мере одной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, например, приблизительно 1-10 или 1-5 аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области по меньшей мере примерно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) гомологичен Fc-области нативной последовательности или последовательности дикого типа и/или Fc-области исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена в вариантной Fc-области усиливает эффекторную функцию вариантной Fc-области по сравнению с Fc-областью нативного или дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция представляет собой биологическую активность, приписываемую Fc-области антитела, которая варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают:

связывание C1q и зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP); понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активация В-клеток.

[0224] Аффинность связывания антитела в отношении Fc-рецептора может быть оценена с использованием любого метода, известного в данной области техники, такого как использование поверхностного плазмонного резонанса и/или ИФА, например, как описано в Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела по настоящему изобретению к Fc $\gamma$ R1A может быть выше, чем у контроля дикого типа, на любое из по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 50 раз или выше.

[0225] В некоторых вариантах осуществления аффинность относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном или мишенью). Например, аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области, включая описанные в данном документе.

[0226] В некоторых вариантах осуществления утверждения о том, что молекула (например, антитело и/или Fc-область) связывается в большей степени, чем другая молекула (например, антитело и/или Fc-область), или что молекула (например, антитело и/или Fc-область) связывается с большей аффинностью, чем другая молекула (например, антитело и/или Fc-область), или другие грамматические эквиваленты относятся к молекуле (например, антителу и/или Fc-области), связывающейся более прочно (например, имеющей более низкую константу диссоциации) с мишенью (например, Fc-рецептором, белком клеточной поверхности), чем другая молекула (например, антитело и/или Fc-область) в анализах связывания (например, как описано в настоящем документе и/или как широко известно в данной области техники) по существу в тех же условиях. Например, утверждение о том, что антитело «X» связывается с рецептором Fc в большей степени, чем антитело «Y», указывает на то, что антитело «X» связывается более прочно (например, имеет более низкую константу диссоциации) с рецептором Fc, чем антитело «Y» в анализах связывания (например, как описано в настоящем документе и/или как общеизвестно в данной области техники) по существу в тех же условиях. В другом примере утверждение о том, что антитело «X» связывается с мишенью (например, белком клеточной поверхности, таким как CD94) с большей аффинностью, чем антитело «Y», указывает на то, что антитело «X» связывается более прочно (например, имеет более

низкую константу диссоциации) с мишенью (например, белком клеточной поверхности, таким как CD94), чем антитело «Y» в анализах связывания (например, как описано в настоящем документе и/или как общеизвестно в данной области техники) по существу в тех же условиях.

*(ii) Снижение фукозилирования*

[0227] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению является нефукозилированным или дефицитным по фукозе, например, гликозилированный вариант антитела, содержащий Fc-область, в которой углеводная структура, присоединенная к Fc-области, имеет уменьшенное количество фукозы или не содержит фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело с пониженным содержанием фукозы или без фукозы имеет улучшенную функцию ADCC. Нефукозилированные или дефицитные по фукозе антитела имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же антителе, продуцируемом в клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления нефукозилированная или дефицитная по фукозе композиция антител по настоящему изобретению представляет собой композицию, в которой менее примерно 50% N-связанных гликанов, присоединенных к Fc-области антител в композиции, содержат фукозу.

[0228] В некоторых вариантах осуществления фукозилирование или фукозилированный относится к остаткам фукозы в составе олигосахаридов, присоединенных к пептидному остову антитела по настоящему изобретению. В частности, фукозилированное антитело содержит  $\alpha$ -(1,6)-связанную фукозу на самом внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, присоединенных к Fc-области антитела, например, в положении Asn 297 Fc-домена IgG1 человека (ЕС-нумерация остатков Fc-области). Asn297 также может быть расположен примерно на +3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности иммуноглобулинов.

[0229] В некоторых вариантах осуществления степень фукозилирования представляет собой процент фукозилированных олигосахаридов по отношению ко всем олигосахаридам, например, как определено способами, известными в данной области техники, например, в композиции антитела, обработанной N-гликозидазой F, оцененной с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией с использованием матрицы (MALDI-TOF MS). В составе полностью фукозилированного антитела по меньшей мере 90% или практически все олигосахариды содержат остатки фукозы, *т.е.* являются фукозилированными. Соответственно, отдельное антитело в такой композиции обычно содержит остатки фукозы в каждом из двух N-связанных олигосахаридов в Fc-области. В некоторых вариантах осуществления в композиции полностью нефукозилированного антитела менее приблизительно 10% или по существу ни один из олигосахаридов не является фукозилированным, и отдельное антитело в такой

композиции не содержит остатков фукозы ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в Fc-области. В составе частично фукозилированного антитела только часть олигосахаридов содержит фукозу. Отдельное антитело в такой композиции может содержать остатки фукозы ни в одном из N-связанных олигосахаридов, в одном или в обоих из N-связанных олигосахаридов в Fc-области, при условии, что композиция не содержит по существу все отдельные антитела, в которых отсутствуют остатки фукозы в N-связанных олигосахаридах в Fc-области, а также практически все отдельные антитела, которые содержат остатки фукозы в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc-области. В одном варианте осуществления состав частично фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования от около 10% до около 80% (*например*, от около 50% до около 80%, от около 60% до около 80% или от около 70% до около 80%).

[0230] В некоторых вариантах осуществления гликозилированный вариант антитела содержит Fc-область, где в углеводной структуре, присоединенной к Fc-области, отсутствует фукоза. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Примеры дефукозилированных или дефицитных по фукозе антител описаны в: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004).

[0231] Антитела с пониженным фукозилированием или нефукозилированные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антител по настоящему изобретению по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела могут быть нефукозилированными. Например, антитела согласно настоящему изобретению со сниженным фукозилированием или нефукозилированные антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены в клеточной линии, имеющей нокаут альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8), и/или сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N- ацетилгликоминилтрансферазу III (GnT-III), и/или сверхэкспрессирующей  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII). Антитела с пониженным фукозилированием или нефукозилированные антитела также могут быть получены с использованием клеточной линии, дефицитной по «FUT8», альфа-1,6-фукозилтрансферазе, которая катализирует перенос фукозы; с использованием клеток яичника китайского хомячка (CHO), например, дефицитных по FUT8 (Ymane-Ohnuki et al., 2004); или использование малых интерферирующих РНК (миРНК) для блокирования экспрессии гена FUT8 (Mori et al., 2004). Другие клеточные линии, которые можно использовать для получения нефукозилированных или дефукозилированных антител или антител со сниженным фукозилированием, известны в данной области техники, например, включают клетки Lec13 CHO с дефицитом фукозилирования белков (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутные клетки

СНО (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)), и клетки, сверхэкспрессирующие  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III) и  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII)..

[0232] В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же антителе, продуцируемом в клетке СНО дикого типа. Например, антитело может иметь меньшее количество фукозы, чем если бы оно продуцировалось нативными клетками СНО (например, клеткой СНО, которая продуцирует нативный паттерн гликозилирования, например, клеткой СНО, содержащей нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления представленное в данном документе антитело представляет собой антитело, в котором менее около 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов содержат фукозу. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено антитело, в котором ни один из N-связанных гликанов на нем не содержит фукозу, т. е. в котором антитело полностью не содержит фукозы, или не содержит фукозы, или нефукозилировано, или афукозилировано. Количество фукозы может определить специалист в данной области техники, например, вычислив среднее количество фукозы в сахарной цепи в положении Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, сложных, гибридных структур с высоким содержанием маннозы) по данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация Eu остатков Fc-области); однако Asn297 также может быть расположен примерно на  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела являются нефукозилированными.

[0233] Антитела, в которых отсутствует 1,6-фукоза при гликозилировании тяжелой цепи, могут иметь повышенную аффинность связывания с рецептором Fc $\gamma$ RIII и повышенную активность ADCC (см., например, Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2002; Okazaki, 2004; Dall'Ozzo, 2004). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, представленные в настоящем документе, включают Fc-область с модификациями, включая пониженное фукозилирование, отсутствие фукозилирования и/или мутации, которые усиливают активность ADCC и/или улучшают аффинность Fc-области к Fc-рецепторам, таким как Fc $\gamma$ RIII и CD16 (например, CD16a). В некоторых вариантах осуществления молекулы, (например, антитела, представленные в настоящем документе), индуцируют антитело-направленную клеточную цитотоксичность (ADCC) и истощать или уменьшать количество NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, в большей степени, чем фукозилированное антитело или антитело дикого типа.

[0234] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению разработано для улучшения активности ADCC за счет снижения фукозилирования. В

некоторых вариантах осуществления молекулы, представленные в настоящем документе (например, антитела, представленные в настоящем документе), могут индуцировать антитело-направленную клеточную цитотоксичность (ADCC) и истощать или уменьшать количество NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, в большей степени, чем фукозилированное антитело или антитело дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела по настоящему изобретению являются нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению модифицируется таким образом, что углеводы антитела нефукозилированы. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению модифицировано таким образом, что менее чем приблизительно 90%, например, менее чем любое из около 90%, около 80%, около 70%, около 60%, около 50%, около 40%, около 30%, около 20%, около 10%, около 5% или около 1% углеводов антитела содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению модифицировано таким образом, что менее около 40% углеводов антитела содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем документе, не являются фукозилированными.

[0235] В некоторых вариантах осуществления молекулы, (например, антитела, представленные в настоящем документе), индуцируют антитело-направленную клеточную цитотоксичность (ADCC) и истощать или уменьшать количество NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, в большей степени, чем фукозилированное антитело или антитело дикого типа.

*(iii) Мутации, усиливающие активность ADCC*

[0236] Антитело по изобретению может содержать вариантную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает активность ADCC. Например, антитело по настоящему изобретению может иметь вариантную Fc-область IgG1, которая содержит одну или несколько мутаций Fc, выбранных из S239D, A330L, I332E, F243L и G236A. В другом примере антитело по настоящему изобретению может иметь вариантную Fc-область IgG1 человека, которая содержит одну или несколько мутаций Fc, выбранных из S239D, A330L, I332E, F243L и G236A. Можно использовать другие аминокислотные замены, которые, как известно, усиливают активность ADCC, например, как описано в Lazar et al., PNAS 103, 4005-4010 (2006); Shields et al., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604 (2001); Stewart et al., Protein Engineering, Design and Selection 24, 671-678 (2011), и Richards et al., Mol Cancer Ther 7, 2517-2527 (2008).

*(iv) Уменьшение интернализации*

[0237] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет низкую степень интернализации, например интернализация, индуцированная рецептором, или интернализация мишени (т. е. интернализация CD94, экспрессируемого на поверхности), например, по сравнению с контрольным антителом дикого типа или антителом, известным в данной области техники, или коммерчески доступным для той же

цели. Антитела с более низкой интернализацией имеют более высокую занятость рецептором (например, CD94) на клеточной поверхности и более высокий уровень комплексов рецептор-антитело на клеточной поверхности, что может усиливать активность ADCC. Антитело по изобретению может быть проверены *in vitro* на способность интернализации. Антитело по настоящему изобретению можно протестировать в анализе *ex vivo*, например, с использованием РВМС и/или NK-клеток, на предмет его способности к интернализации, например, как описано в примерах. Интернализация мишени (например, CD94) может быть выражена как процентное снижение средней интенсивности флуоресценции (MFI) за период времени с использованием анализа на основе проточной цитометрии, например, как описано в примерах. Например, интернализация мишени (т.е. способность интернализации антитела по настоящему изобретению) может быть выражена в виде процентного снижения MFI, рассчитанного путем вычисления разницы в MFI за 24-часовой период (например, между 0,5 и 24 часами) в клетках, инкубированных с антителом при 37 градусах Цельсия и умноженных на 100, например, как описано в примерах.

[0238] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет высокую степень интернализации, если оно приводит к снижению MFI более чем на 50%, рассчитанному путем вычисления разницы в MFI за 24-часовой период (например, между 0,5 и 24 часами) в клетках, инкубированных с антителом при 37°C, и умножение на 100 при измерении с помощью анализа *ex vivo*, например, с использованием РВМС и/или NK-клеток, как описано в примерах. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет высокую степень интернализации, если инкубация антитела с клеткой, экспрессирующей CD94 человека на ее поверхности, в течение 24 часов при 37°C приводит к снижению окрашивания поверхности антитела более чем на 50% вследствие интернализации, оцененной с использованием способов, известных в данной области техники, и/или как описано выше.

[0239] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет низкую степень интернализации, если оно приводит к снижению MFI менее чем на 50% (например, любое из около 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее, 1% или менее или 0%), рассчитанному путем вычисления разницы в MFI за 24-часовой период (например, между 0,5 и 24 часами) в клетках, инкубированных с антителом при 37°C, и умножение на 100 при измерении с помощью анализа *ex vivo*, например, с использованием РВМС и/или NK-клеток, как описано в примерах. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет низкую степень интернализации и приводит к снижению MFI на около 50% или менее, около 40% или менее, около 35% или менее, около 30% или менее, около 25% или менее, около 20% или менее, около 15% или менее, около 10% или менее, около 5% или менее, около 2,5% или менее, около 1% или менее или около 0%, рассчитанному, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет низкую степень интернализации, если инкубация антитела с клеткой, экспрессирующей

CD94 человека на ее поверхности, в течение 24 часов при 37°C приводит к снижению окрашивания поверхности антитела менее чем на 50% вследствие интернализации, оцененной с использованием способов, известных в данной области техники, и/или как описано выше.

[0240] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет или приводит к активности интернализации, которая составляет по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 99% или около 100% ниже интернализации контрольного антитела, например, коммерческого контрольного антитела или контрольного антитела дикого типа, или контрольного изотипического антитела, при этом интернализация оценивается, как описано выше, и/или с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники.

[0241] Кандидаты в антитела с нулевой активностью интернализации или с низкой активностью могут быть дополнительно протестированы на связывание с мишенью яванского макака и/или человека (например, CD94 яванского макака и/или человека). Антитела, которые связываются с яванским макаком и/или человеком-мишенью, можно использовать для анализов уничтожения клеток (например, анализов ADCC) *in vitro* и *in vivo*. Активность по уничтожению клеток (например, активность ADCC) выбранных антител можно сравнить с коммерчески доступными антителами или антителами, известными в данной области техники.

#### *Е. Образование антител*

[0242] Антитело по настоящему изобретению может быть получено с использованием любых технологий и/или способов, известных в данной области техники. Способы получения антител, например моноклональных антител (mAb), практически к любому антигену-мишени, хорошо известны в данной области техники. См., например, Köhler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), and Coligan et al. (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Вкратце, моноклональные антитела можно получить путем инъекции мышам композиции, содержащей антиген (например, CD94 или его часть), удаления селезенки для получения В-лимфоцитов, слияния В-лимфоцитов с клетками миеломы для получения гибридом, клонирования гибридомы, отбора положительных клонов, продуцирующих антитела к антигену, культивирования клонов, продуцирующих антитела к антигену, и выделения антител из культур гибридом. Специалисту с обычной квалификацией будет понятно, что если антитела должны быть введены субъектам-людям, антитела будут связываться с человеческими антигенами (например, CD94 человека или его частью).

[0243] MAб могут быть выделены и очищены из гибридомных культур с помощью различных хорошо зарекомендовавших себя методов. К таким методам выделения относятся аффинная хроматография с белок-А или белок-G-сефарозой, эксклюзионная

хроматография и ионообменная хроматография. См., например, Coligan на стр. 2.7.1-2.7.12 и стр. 2.9.1-2.9.3. См. также Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

[0244] После первоначального образования антител к иммуногену (например, CD94 или его части) антитела могут быть секвенированы и впоследствии получены рекомбинантными методами. Гуманизация и химеризация мышинных антител и фрагментов антител хорошо известны специалистам в данной области техники, как обсуждается ниже.

[0245] В иллюстративном способе получения антитела по изобретению рекомбинантные мишени (например, CD94) могут быть использованы для иммунизации мышей. Антитела, полученные после иммунизации мышей, например, как описано выше, можно анализировать на специфическое или селективное связывание с их мишенью (например, CD94) с помощью ИФА и проточной цитометрии. Антитела могут быть выбраны на основе их способности связываться с мишенью (например, CD94).

[0246] В некоторых вариантах осуществления могут быть получены антитела приматов, отличных от человека. Общие методики получения терапевтически полезных антител у павианов можно найти, например, у Goldenberg et al., WO 91/11465 (1991), и у Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990).

[0247] В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть моноклональным человеческим антителом. В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антител, продуцируемых человеком или человеческой клеткой, или происходящих из источника, отличного от человека, который использует репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Такие антитела могут быть получены от трансгенных мышей, которые были сконструированы таким образом, чтобы продуцировать специфические человеческие антитела в ответ на антигенную стимуляцию, например, CD94 или его часть. Способы получения полностью человеческих антител с использованием либо комбинаторных подходов, либо трансгенных животных, трансформированных локусами иммуноглобулина человека, известны в данной области техники (например, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke and Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). В определенных вариантах осуществления заявленные способы и процедуры могут использовать человеческие антитела, полученные такими методами. Другие способы получения полностью человеческих антител включают фаговый дисплей, например, как описано у Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40, получение антител у здоровых людей или у людей, у которых наблюдается конкретное болезненное состояние, например, как описано у Dantas-Barbosa et al., 2005, или с использованием трансгенных животных (например, мышей), которые были генетически сконструированы для получения антител

человека с использованием стандартных протоколов иммунизации, как обсуждалось выше, например, как описано у Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), and Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994).

*(i) Анализы уничтожения клеток in vitro*

[0248] Получение антитела по настоящему изобретению может включать тестирование активности ADCC антитела *in vitro*. Улучшенное уничтожение клеток или ADCC-активность антитела по настоящему изобретению можно протестировать, как описано выше, как описано в примерах, и/или с использованием способов, известных в данной области техники. Улучшенное уничтожение клеток или ADCC-активность антитела по настоящему изобретению можно тестировать на истощение NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94. Истощение NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, можно протестировать с использованием типовой модели *in vitro*, которая повторяет активность у людей (Tomasevic, et al, *Growth Factors*, 2014; 32(6): 223-235; Huang, et al. , *JCI Insight*, 2016;1(7):e86689). Лимфоциты периферической крови (PBL), выделенные из крови нормальных (т.е. здоровых) доноров, инкубируют с антителами, которые имеют Fc-область человека с фукозой и без нее и/или с мутациями Fc-области и без них. Уровень уничтожения NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94 в PBL (например, в образце PBL), измеряют с использованием любого метода, известного в данной области техники, такого как проточная цитометрия (например, как описано в примерах). Активность антител в отношении уничтожения клеток (например, активность ADCC) может быть протестирована, как описано выше, например, с использованием анализа, описанного выше, с использованием различных биологических образцов, таких как гомогенаты интактных клеток крови, синовиальной жидкости, костного мозга и селезенки от пациентов с заболеваниями, такими как NK/Т-клеточные лимфомы, например, экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, хроническое лимфопролиферативное заболевание NK-клеток (CLPD-NK), лейкоз LGL, синдром Фелти, CLPD-NK, IBM и PA с LGL и/или агрессивным лейкозом NK.

[0249] В дополнение к анализу уничтожения клеток, описанному выше, анализы ADCC и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) *in vitro* с использованием антител по настоящему изобретению, очищенных клеток-мишеней (например, NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94) и/или эффекторных клеток, таких как NK-клетки или моноциты/макрофаги, могут быть выполнены для анализа уничтожения гибели, активности ADCC и/или ADCP антител по настоящему изобретению. Можно использовать анализы уничтожения клеток, ADCC и/или ADCP и другие способы анализа, известные в данной области техники, например, как описано в Kolbeck et al., *J Allergy Clin*

Immunol. 2010;125(6):1344-1353.e2; Gomez-Roman et al., J. Immunol. Methods, 2006, 308, pp. 53-67; and Ackerman et al., J. Immunol. Methods, 2011, 366, pp. 8-19. Активность *in vitro* антитела по настоящему изобретению можно сравнить с активностью коммерчески доступного антитела или антитела, известного в данной области техники, против той же мишени.

*(ii) Анализы уничтожения клеток in vivo*

[0250] Получение антитела по настоящему изобретению может включать тестирование ADCC-активности антитела *in vivo*, например, для демонстрации активности выбранных антител-кандидатов *in vivo* в отношении истощения или снижения уровней NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94. Активность в отношении уничтожения клеток *in vivo* (например, активность ADCC и/или ADCP) антитела по настоящему изобретению может быть определена с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, способность антитела по настоящему изобретению истощать или уменьшать количество NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, *in vivo*, можно тестировать на яванских макаках с использованием способов, известных в данной области техники. Например, в иллюстративном способе тестирования активности *in vivo* в отношении к уничтожению клеток (например, активности ADCC и/или ADCP) антитела по настоящему изобретению у когорты яванских макаков берут кровь за один день до введения разовой дозы антитела по настоящему изобретению, например, лечение антителами, для определения предварительных дозовых уровней NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, с помощью проточной цитометрии. После введения антитела по настоящему изобретению, например, при лечении антителами по настоящему изобретению у обезьян берут кровь в следующие моменты времени: 1 час, 1 день, 7 дней, 14 дней и 30 дней. Уровни NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, в крови и других биологических образцах, таких как синовиальные жидкости, костный мозг и селезенка, определяют с помощью проточной цитометрии в каждый момент времени. Активность *in vivo* антитела по настоящему изобретению можно сравнить с активностью коммерчески доступного антитела или антитела, известного в данной области техники, против той же мишени. Антитело к CD94 по настоящему изобретению можно сравнить с клонами антитела к CD94 DX22, HP-3D9, HP-3B1, 131412 или 12K45.

[0251] Специалисту в данной области техники будет понятно, что другие способы, известные в данной области техники для тестирования активности ADCC *in vivo*, могут быть использованы для анализа активности ADCC *in vivo* антител по настоящему изобретению (например, трансгенных животных, таких как трансгенные мыши).

[0252] Другие известные антитела против мишени (например, CD94) также могут быть использованы в способах, представленных в настоящем документе. Например, антитело к CD94 по настоящему изобретению может быть протестировано (например, на активность ADCC *in vitro* или *in vivo* или на любую другую характеристику, описанную в настоящем документе) вместе со следующими антителами к CD94: HP-3D9 (каталог

LSBio № LS-C134679-100; № по каталогу Abnova: MAB6947); 2I2; 131412 (номер по каталогу научно-исследовательских систем: MAB1058); 13B146 (№ в биологическом каталоге США: 030068); 13B147 (№ в биологическом каталоге США: 030069); 1H1 (№ по каталогу Abnova: MAB10543); 3G2 (№ по каталогу Biorbyt: orb69389); DX22 (№ по каталогу Biologend 305502); REA113 (№ по каталогу Miltenyi Biotec: 130-098-967); KP43; EPR21003; AT13E3 (каталог ATGen: ATGA0487); HP-3B1; 12K45 и B-D49.

*(iii) Гуманизация*

[0253] Антитело по настоящему изобретению может быть гуманизировано любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело представляет собой химерное антитело, содержащее аминокислотные остатки из нечеловеческих гипервариабельных областей (HVR) и аминокислотные остатки из человеческих каркасных областей (FR). В определенных вариантах осуществления гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все HVR (например, CDR) соответствуют таковым у нечеловеческого антитела, и все или по существу все FR соответствуют FR человеческого антитела. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую от человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная форма антитела, например, нечеловеческое антитело, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

[0254] Например, моноклональное антитело можно гуманизировать путем переноса CDR мыши из тяжелой и легкой вариабельных цепей иммуноглобулина мыши в соответствующие вариабельные домены человеческого антитела. Каркасные области мыши (FR) в химерном моноклональном антителе также могут быть заменены последовательностями FR человека. Для сохранения стабильности и антигенной специфичности гуманизованного моноклонального антитела один или несколько остатков FR человека могут быть заменены остатками-аналогами мыши. Гуманизованные моноклональные антитела можно использовать для терапевтического лечения субъектов. Методы получения гуманизованных моноклональных антител хорошо известны в данной области техники, например, как описано в Jones et al., 1986, Nature, 321:522; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534; Carter et al., 1992, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:4285; Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, Biotechnology 9:266; Singer et al., J. Immun., 1993, 150:2844.

[0255] Антитело по настоящему изобретению может иметь одну или несколько характеристик, описанных выше, например, повышенную активность уничтожения клеток *in vitro* и/или *in vivo* (например, активность ADCC и/или ADCP), усиленное связывание с одним или несколькими Fc-рецепторами, сниженное фукозилирование или нефукозилирование, перекрестную реактивность (например, связывание с CD94 человека и CD94 яванского макака), отсутствие блокирования связывания HLA-E с гетеродимером

CD94/NKG2A, конкурирование с коммерчески доступными антителами (например, коммерчески доступными антителами к CD94), низкая интернализация и/или желаемая аффинность к белку-мишени (например, CD94, CD94 человека и/или CD94 яванского макака).

[0256] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению растворимо при концентрациях выше, чем около 10 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению образует низкий уровень растворимых агрегатов (например, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% растворимых агрегатов). В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению обладает способностью поддерживать связывание со своей мишенью (например, CD94) во время хранения, например, в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев или более, при любой из около 2°C, около 3°C, около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C, около 8°C. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет стабильность (например, отсутствие продуктов разложения, например, как измерено с помощью SDS-PAGE) при хранении, например, в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев или более, при любой температуре из около 2°C, около 3°C, около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C или около 8°C.

[0257] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению тестируют в отношении токсикологии. Токсикологический анализ антитела по настоящему изобретению может быть проведен с использованием любого метода, известного в данной области техники. В типичном токсикологическом анализе антитело по настоящему изобретению тестируют на токсичность у яванских макаков в дозах, которые более чем в 5 раз выше (например, любая из примерно в 5 раз выше, примерно в 10 раз выше, примерно в 15 раз выше, примерно в 20 раз выше, примерно в 25 раз выше, примерно в 30 раз выше, примерно в 35 раз выше, примерно в 40 раз выше, примерно в 45 раз выше, примерно в 50 раз выше, примерно в 55 раз выше, примерно в 60 раз выше, примерно в 65 раз выше, примерно в 70 раз выше, примерно в 75 раз выше, примерно в 80 раз выше, примерно в 85 раз выше, примерно в 90 раз выше, примерно в 95 раз выше, примерно в 100 раз выше или более), чем дозы, которые предполагается использовать у субъектов-людей.

[0258] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению способно истощать или снижать уровень NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, *in vitro* и/или *in vivo*. Истощение или снижение уровня NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, можно измерить с помощью любого метода, известного в данной области техники. Например, истощение NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, можно измерить с помощью анализа уничтожения клеток, ADCC и/или ADCP, например, как описано выше и/или как описано в примерах.

[0259] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему

изобретению растворимо при концентрациях выше 10 мг/мл, имеет низкий уровень растворимых агрегатов (<5%), сохраняет свое связывание с мишенью, как измерено с помощью ИФА (эффективность >90%), без продуктов деградации, как измерено методом SDS PAGE при инкубации в течение 3 месяцев при 2-8°C. В некоторых вариантах осуществления токсикологический анализ антитела по настоящему изобретению может быть выполнен на яванских макаках в дозах, которые более чем в 5 раз превышают дозы, предполагаемые для применения у субъектов-людей.

[0260] В некоторых вариантах осуществления антитела, которые связываются с CD94, могут истощать или снижать уровень NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, и могут иметь явные преимущества для пациентов (например, пациентов-людей) с заболеваниями или нарушениями, такими как лейкоз LGL, ревматоидный артрит, синдром Фелти, CLPD-NK, агрессивный NK-лейкоз, IBM, IBD или NK-/Т-клеточная лимфома, такая как экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), связанная с энтеропатией TCL, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL или подкожная панникулитная TCL. Кроме того, лечение антителами может иметь лучшую переносимость и меньше побочных эффектов по сравнению с первой и второй линией терапии, включая химиотерапию, такую как циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон; трансплантация стволовых клеток; спленэктомия; алемтузумаб; бевацизумаб; пралатрексат; авелумаб; ингибиторы протеасом, такие как карфилзомиб и бортезомиб; ингибиторы HDAC, такие как ромидепсин, белиностаг и вориностаг; и конъюгаты антитело-лекарственное средство, такие как брентуксимаб ведотин. Лечение антителами может демонстрировать более избирательное истощение клеток, вызывающих заболевание, по сравнению с современными неселективными методами лечения. Неограничивающими примерами заболеваний и нарушений, в развитии которых могут играть роль NK-клетки и/или Т-клетки, экспрессирующие CD94, являются: лейкоз LGL, ревматоидный артрит, синдром Фелти, CLPD-NK, агрессивный NK-лейкоз, IBM, IBD или NK-/Т-клеточная лимфома, такая как экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), ассоциированная с энтеропатией TCL, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL или подкожная панникулитная TCL. Соответственно, изобретение обеспечивает способ уменьшения количества или истощения IEL, которые экспрессируют CD94, у человека при введении молекулы, которая связывается с CD94 и содержит (а) область, которая специфически связывается с мишенью (например, CD94) и (б) Fc-область

иммуноглобулина.

## *II. Применение и способы лечения*

[0261] Как обсуждалось выше, NK-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки и/или CD8+ и CD4+ Т-клетки участвуют в патогенезе многочисленных заболеваний и нарушений, таких как NK-/Т-клеточные лимфомы. Многие из этих нарушений или заболеваний характеризуются клональной экспансией NK-клеток и/или CD8+ и CD4+ Т-клеток.

[0262] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрены молекулы (например, антитела), которые связываются с CD94, например, экспрессируются на поверхности NK-клеток и/или Т-клеток. Также в настоящем документе предусмотрены молекулы (например, антитела), которые связываются с CD94 и которые имеют пониженное фукозилирование, нефукозилирование (например, которые имеют Fc-область иммуноглобулина с модификациями или мутациями, которые снижают или устраняют фукозилирование). В настоящем документе также предусмотрены молекулы (например, антитела), которые связываются с CD94 и имеют модификации или мутации, которые усиливают активность ADCC и/или улучшают аффинность Fc-области к Fc-рецепторам, таким как CD16 (например, CD16a). Также в настоящем документе предусмотрены молекулы (например, антитела), которые связываются с CD94 и обладают одной или несколькими из следующих характеристик: связываются с CD94 человека и CD94 яванского макака, не блокируют связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеют низкую степень интернализации, нефукозилированы или имеют пониженное фукозилирование и/или индуцируют, стимулируют или усиливают активность ADCC.

[0263] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела, описанного в настоящем документе, которое специфически связывается с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела, которое специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, не является фукозилированным или имеет сниженное фукозилирование и/или индуцирует, стимулирует или усиливает активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение выбрано из хронического лимфопролиферативного заболевания NK-клеток (CLPD-NK), лейкоза LGL, синдрома Фелти, ревматоидного артрита, агрессивного лейкоза NK, миозита с тельцами-включениями, воспалительного заболевания кишечника или NK/Т-клеточной лимфомы, такой как экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL,

TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL, подкожная панникулитная TCL или микроскопический колит. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению количества NK-клеток и/или T-клеток, которые экспрессируют CD94. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению количества NK-клеток, CD8+, CD4+ или CD8+/CD4+ T-клеток и/или клеток LGL периферической крови у субъекта, например, которые экспрессируют CD94. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению числа клеток LGL периферической крови, например, экспрессирующих CD94, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению числа клеток NK периферической крови, например, экспрессирующих CD94, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению числа CD8+/CD4+ T-клеток периферической крови, например, экспрессирующих CD94, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению числа CD8+ T-клеток периферической крови, например, экспрессирующих CD94, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение антитела приводит к снижению числа CD4+ T-клеток периферической крови, например, экспрессирующих CD94, у субъекта.

[0264] В настоящем документе также предложен способ уменьшения количества NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по настоящему изобретению, которое специфически связывается с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, нефукозилировано или имеет сниженное фукозилирование, и/или индуцирует, способствует или усиливает активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, выбранное из хронического лимфопролиферативного заболевания NK-клеток (CLPD-NK), лейкоза LGL, синдрома Фелти, ревматоидного артрита, агрессивного лейкоза NK, миозита с тельцами-включениями, воспалительного заболевания кишечника или NK/T-клеточной лимфомы, такой как экстранодальная NK/T-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная T-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL, подкожная панникулитная TCL или микроскопический колит. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту приводит к снижению количества NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, по сравнению с тем, что было до введения антитела.

[0265] В настоящем документе также предложен способ индукции активности ADCC у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по

настоящему изобретению, которое специфически связывается с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, нефукозилировано или имеет сниженное фукозилирование, и/или индуцирует, усиливает или способствует активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, выбранное из хронического лимфопролиферативного заболевания NK-клеток (CLPD-NK), лейкоза LGL, синдрома Фелти, ревматоидного артрита, агрессивного лейкоза NK, миозита с тельцами-включениями, воспалительного заболевания кишечника или NK/Т-клеточной лимфомы, такой как экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL, подкожная панникулитная TCL или микроскопический колит. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту приводит к снижению количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, по сравнению с тем, что было до введения антитела.

[0266] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой CLPD-NK. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой лейкоз LGL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой синдром Фелти. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой агрессивный лейкоз NK. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой миозит с тельцами-включениями. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой Т-крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз (Т-LGLL). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой лейкоз натуральных клеток-киллеров-больших гранулярных лимфоцитов (NK-LGLL). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой NK-/Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой экстранодальную NK-/Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой TCL, ассоциированную с энтеропатией. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой кожную TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+). В

некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой периферическую TCL (не указано иное). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ангиоиммунобластную TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой TCL взрослых. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой мономорфную эпителиотропную кишечную TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой эпидермотропную CD8+ кожную TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой первичную кожную гамма/дельта TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой подкожную панникулитную TCL. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой микроскопический колит.

[0267] В настоящем документе также предложен способ лечения CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению, где антитело специфически связывается с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к улучшению симптомов CLPD-NK у человека.

[0268] В настоящем документе также предложен способ лечения NK/T-клеточной лимфомы у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению, где антитело специфически связывается с CD94 человека. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к улучшению симптомов NK-/T-клеточной лимфомы у человека. В некоторых вариантах осуществления NK-/T-клеточная выбрана из экстранодальной NK-/T-клеточной лимфомы, печеночно-селезеночной T-клеточной лимфомы (TCL), TCL, ассоциированной с энтеропатией, кожной TCL, анапластической крупноклеточной лимфомы (ALK+), анапластической крупноклеточной лимфомы (ALK-), периферической TCL (если другое не указано), ангиоиммунобластной TCL, TCL взрослых, мономорфной эпителиотропной кишечной TCL, эпидермотропной CD8+ кожной TCL, первичной кожной гамма/дельта TCL или подкожной панникулитной TCL.

[0269] В настоящем документе также предложен способ лечения CLPD-NK у нуждающегося в этом человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению, где антитело специфически связывается с CD94 человека, причем антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, не является фукозилированным или имеет сниженное фукозилирование и/или индуцирует, усиливает или способствует активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к

улучшению симптомов CLPD-NK у человека.

[0270] В настоящем документе также предложен способ лечения NK/Т-клеточной лимфомы у нуждающегося в этом человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению, где антитело специфически связывается с CD94 человека, причем антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, не является фукозилированным или имеет сниженное фукозилирование и/или индуцирует, усиливает или способствует активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к улучшению симптомов NK-/Т-клеточной лимфомы у человека. В некоторых вариантах осуществления NK-/Т-клеточная выбрана из экстранодальной NK-/Т-клеточной лимфомы, печеночно-селезеночной Т-клеточной лимфомы (TCL), TCL, ассоциированной с энтеропатией, кожной TCL, анапластической крупноклеточной лимфомы (ALK+), анапластической крупноклеточной лимфомы (ALK-), периферической TCL (если другое не указано), ангиоиммунобластной TCL, TCL взрослых, мономорфной эпителиотропной кишечной TCL, эпидермотропной CD8+ кожной TCL, первичной кожной гамма/дельта TCL или подкожной панникулитной TCL. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией. В некоторых вариантах осуществления NK-клеточная или Т-клеточная лимфома характеризуется NK-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими CD94 (*например*, CD94 человека).

[0271] В настоящем документе также предложен способ лечения микроскопического колита у нуждающегося в этом человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению, где антитело специфически связывается с CD94 человека, причем антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, не является фукозилированным или имеет сниженное фукозилирование и/или индуцирует, усиливает или способствует активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к улучшению симптомов микроскопического колита у человека. Микроскопический колит представляет собой желудочно-кишечное заболевание, характеризующееся воспалением толстой кишки, приводящим к персистирующей бескровной водянистой диарее. Он называется микроскопическим, потому что разрушение ткани можно увидеть только под микроскопом, а не при макроскопическом исследовании. Толстая кишка у этих пациентов выглядит макроскопически нормальной или имеет почти нормальную слизистую оболочку толстой кишки. В настоящее время существует два подтипа микроскопического колита: коллагеновый колит, характеризующийся накоплением слоя коллагена в слизистой оболочке кишечника, и лимфоцитарный колит, характеризующийся увеличением

лимфоцитов в ткани толстой кишки. В настоящее время им страдают 100/100 000 человек во всем мире, из которых 39,3% случаев относятся к лимфоцитарному подтипу (Hisamatsu et al. (2016) *Inflamm. Intest. Dis.* 2:52-62). Текущие причины микроскопического колита неизвестны, но общие факторы включают прием лекарств, бактериальные и вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, глютеновая болезнь или псориаз, а также накопление желчных кислот. Актуальным методом диагностики является гистологическое исследование кишечной ткани, так как без гистопатологического исследования биопсийного материала невозможно диагностировать заболевание. Общие симптомы микроскопического колита включают постоянную водянистую диарею, приводящую к потере веса, вздутию живота, анемии, недоеданию и т. д. Нет никакого лечения или надлежащего лечения микроскопического колита, кроме противодиарейных препаратов, продуктов с низким содержанием жиров, клетчатки и молочных продуктов с низкой жирностью, стероидов, блокаторов желчных кислот, противовоспалительных препаратов, ингибиторов TNF или, в самых редких случаях, операции по удалению части или всей толстой кишки. Хотя неясно, какие клетки являются основными болезнетворными клетками при микроскопическом колите, исследования показали, что в толстой кишке пациентов с микроскопическим колитом наблюдается повышение CD8+ интраэпителиальных лимфоцитов (IEL) (Goranzon et al. (2013) *J. Crohns Colitis* 7:e434-442). В литературе есть данные, свидетельствующие о высокой экспрессии CD94 на IEL при микроскопическом колите (Barmeyer et al. (2016) *Inflamm. Bowel Dis.* 22:539-547). Не желая быть связанными теорией, считается, что антитело к CD94 (*например*, нефукозилированное антитело IgG1) может вызывать ADCC на клетках IEL посредством фратрицида. В литературе также предполагается, что уровень CD16 сильно повышен в биоптатах микроскопического колита по сравнению с нормальным контролем, что позволяет предположить, что IEL могут задействовать антитело к CD94, чтобы индуцировать ADCC на других клетках IEL (Barmeyer et al. (2016) *Inflamm. Bowel Dis.* 22:539-547). Не желая быть связанными теорией, считается, что клетки IEL являются цитотоксическими и могут служить как эффекторными, так и клетками-мишенями.

[0272] В настоящем документе также предложен способ усиления терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) у нуждающегося в этом человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по настоящему изобретению перед введением лечения CAR-T субъекту, при этом антитело специфически связывается с CD94 человека, при этом антитело обладает одной или несколькими из следующих характеристик: не блокирует связывание HLA-E с гетеродимером CD94/NKG2A, имеет низкую степень интернализации, нефукозилирован или имеет пониженное фукозилирование и/или индуцирует, усиливает или способствует активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту-человеку приводит к истощению NK-клеток у субъекта перед получением лечения с помощью CAR-T. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-терапия предназначена

для лечения рака, *т.е.* субъект имеет рак/лечится от рака. Короткий период полураспада CAR-T-клеток для лечения различных гематологических и солидных видов раков существенно сдерживает развитие клеточной терапии. Лимфоразрушающая химиотерапия обычно используется перед лечением CAR-T, таким как циклофосфамид с флударабином или без него (Flu). Однако эти стандартные химиотерапевтические препараты не истощают надлежащим образом NK-клетки, что приводит к элиминации готовых CAR-T-клеток вскоре после инфузии. Не желая привязываться к теории, считается, что лечение антителами к CD94 может потенциально временно истощать NK-клетки, чтобы обеспечить приживание HLA-дефицитных клеток класса I («универсальные CAR T-клетки») или органов для предотвращения опосредованного NK-клетками отторжения. Временное истощение NK-клеток должно обеспечивать окно для приживания HLA класса I-отрицательных клеток и не представлять риска для безопасности. После того, как антитела, истощающие CD94, исчезнут, количество NK-клеток может вернуться к норме. Вновь возникающие NK-клетки должны стать толерантными к перенесенным HLA класса I-отрицательным клеткам (на основе экспериментов со смешанной химерой костного мозга). Таким образом, лечение антителами к CD94 может дать возможность усилить CAR-T-терапию, *например*, у онкологических больных.

[0273] В некоторых вариантах осуществления термины лечить, лечащий, лечение, улучшать, улучшающий, уменьшать один или несколько симптомов, уменьшать симптомы, уменьшать один или несколько симптомов, уменьшать симптомы и другие грамматические эквиваленты относятся к облегчению, ослаблению или улучшению одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, предотвращению дополнительных симптомов, облегчению или предотвращению основных причин симптомов, подавлению заболевания или нарушения, например, остановке развития заболевания или нарушения, облегчению заболевания или нарушения, регрессированию заболевания или нарушения, облегчению состояния, вызванного заболеванием или нарушением, или прекращению симптомов заболевания или нарушения, и предназначены для включения профилактики. В некоторых вариантах осуществления термины дополнительно включают достижение терапевтического эффекта и/или профилактического эффекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая польза относится к устранению или уменьшению основного заболевания или нарушения, подлежащего лечению. Кроме того, терапевтическая польза достигается за счет устранения или улучшения одного или нескольких физиологических симптомов, связанных с основным заболеванием или нарушением, так что у пациента наблюдается улучшение, несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления пациент все еще страдает от основного заболевания или нарушения. С профилактической целью фармацевтические композиции вводят пациенту с риском развития конкретного заболевания или нарушения или пациенту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания или нарушения, даже если диагноз заболевания или нарушения еще не поставлен.

[0274] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество, терапевтически эффективное количество или фармацевтически эффективное количество может представлять собой достаточное количество по меньшей мере одной вводимой фармацевтической композиции или соединения (например, антитела согласно настоящему изобретению), которое в некоторой степени облегчит один или несколько симптомов заболевания или состояние, которое подлежит лечению.

[0275] В некоторых вариантах осуществления снижение количества NK-клеток периферической крови и/или Т-клеток, экспрессирующих CD94, у субъекта происходит в диапазоне первых 24 часов, например, в течение примерно 1 часа, в течение примерно 2 часов, в течение примерно 3 часов, в течение примерно 4 часов, в течение примерно 5 часов, в течение примерно 6 часов, в течение примерно 7 часов, в течение примерно 8 часов, в течение примерно 9 часов, в течение примерно 10 часов, в течение примерно 11 часов, в течение примерно 12 часов, в течение примерно 13 часов, в течение примерно 14 часов, в течение примерно 15 часов, в течение примерно 16 часов, в течение примерно 17 часов, в течение примерно 18 часов, в течение примерно 19 часов, в течение примерно 20 часов, в течение примерно 21 часов, в течение примерно 22 часов, в течение примерно 23 часов или в течение примерно 24 часов после введения антитела субъекту.

[0276] В некоторых вариантах осуществления количество NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта (*например*, в образце периферической крови, полученном от субъекта), снижается до уровня ниже предела для клинической диагностики заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления количество NK-клеток периферической крови и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, у субъекта снижается до менее чем или равного  $2 \times 10^9$  клеток/л (*например*, в образце периферической крови, полученном от субъекта). См., *например*, Lamu, T. et al. (2017) Blood 129:1082-1094. В некоторых вариантах осуществления снижение числа NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, экспрессирующих CD94, у субъекта до уровня ниже предела для клинической диагностики заболевания или нарушения, присутствует у субъекта, в течение по меньшей мере около 1 недели, например, любого из периодов по меньшей мере около 1 недели, по меньшей мере около 2 недель, по меньшей мере около 3 недель, по меньшей мере около 4 недель, по меньшей мере около 1 месяца, по меньшей мере около 2 месяцев, по меньшей мере около 3 месяцев, по меньшей мере около 4 месяцев, по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев или более после введения антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления снижение количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта до уровня менее или равного  $2 \times 10^9$  клеток/л у субъекта (*например*, в образце периферической крови, полученном от субъекта), присутствует у субъекта в течение по меньшей мере около 1 недели, например, любое из по меньшей мере около 1 недели, по меньшей мере около 2 недель, по меньшей мере около 3 недель, по меньшей мере около 4 недель, по меньшей мере около 1 месяца, по меньшей мере около 2 месяцев, по меньшей мере около 3

месяцев, по меньшей мере около 4 месяцев, по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев или более после введения антитела субъекту.

[0277] В некоторых вариантах осуществления количество NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта снижается до уровня ниже предела обнаружения для NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение числа NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, экспрессирующих CD94, у субъекта до уровня ниже предела обнаружения NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, экспрессирующих CD94, присутствует у субъекта, в течение по меньшей мере около 1 недели, например, любого из периодов по меньшей мере около 1 недели, по меньшей мере около 2 недель, по меньшей мере около 3 недель, по меньшей мере около 4 недель, по меньшей мере около 1 месяца, по меньшей мере около 2 месяцев, по меньшей мере около 3 месяцев, по меньшей мере около 4 месяцев, по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев или более после введения антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки и/или Т-клетки периферической крови, которые экспрессируют CD94, выявляют с помощью проточной цитометрии (*например*, в образце периферической крови субъекта).

[0278] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки периферической крови, экспрессирующие CD94, являются яркими CD3<sup>+</sup> CD56. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки периферической крови, экспрессирующие CD94, представляют собой CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>.

[0279] В некоторых вариантах осуществления снижение числа NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта является обратимым. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, экспрессирующих CD94, у субъекта является обратимым в течение любого из периодов примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 1 месяца, примерно 2 месяцев, примерно через 3 месяцев, примерно через 4 месяцев, примерно через 5 месяцев, примерно 6 месяцев или более после введения антитела субъекту.

[0280] В некоторых вариантах осуществления заявление о том, что клетка или популяция клеток являются положительными (+) или экспрессируют определенный маркер (например, CD3, CD4, CD8, CD16, CD94, NKG2A и т. д.), относится к обнаруживаемому присутствию на или в клетке конкретного маркера. В некоторых вариантах осуществления заявление о том, что клетка или популяция клеток являются положительными для, + или экспрессируют поверхностный маркер (например, белок клеточной поверхности), относится к наличию экспрессии определенного маркера на клеточной поверхности, например, как обнаружено с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания,

обнаруженный при выполнении той же процедуры с контролем, совпадающим по изотипу, и/или гейтирующий контроль флуоресценции минус один (FMO) в идентичных условиях и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера, и/или на уровне, значительно превышающем уровень для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными для маркера.

[0281] В некоторых вариантах осуществления заявлено о том, что клетка или популяция клеток являются отрицательными (-) или не экспрессируют определенный маркер (например, CD3, CD4, CD8, CD16, CD94, NKG2A и т. д.), относится к отсутствию обнаруживаемого присутствия на или в клетке конкретного маркера. В некоторых вариантах осуществления заявлено о том, что клетка или популяция клеток являются отрицательными для, -, или не экспрессируют поверхностный маркер (например, белок клеточной поверхности), относится к отсутствию экспрессии определенного маркера на клеточной поверхности, например, как обнаружено с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно равном или ниже уровня окрашивания, обнаруженный при выполнении той же процедуры с контролем, совпадающим по изотипу, и/или гейтирующий контроль флуоресценции минус один (FMO) в идентичных условиях и/или на уровне, по существу ниже уровня для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера, и/или на уровне, по существу таком же или ниже уровня для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными для маркера.

[0282] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет EC50 или IC50 для снижения NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта в диапазоне от около 1 нг/мл до около 100 нг/мл, например, любое из около 1 нг/мл, около 5 нг/мл, около 10 нг/мл, около 15 нг/мл, около 20 нг/мл, около 25 нг/мл, около 30 нг/мл, около 35 нг/мл, около 40 нг/мл, около 45 нг/мл, около 50 нг/мл, около 55 нг/мл, около 60 нг/мл, около 65 нг/мл, около 70 нг/мл, около 75 нг/мл, около 80 нг/мл, около 85 нг/мл, около 90 нг/мл, около 95 нг/мл или около 100 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет IC50 или EC50 для снижения NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта от около 10 нг/мл до около 80 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет IC50 или EC50 для снижения NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта около 20 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет IC50 или EC50 для снижения NK-клеток и/или T-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта около 60 нг/мл. EC50 или IC50 можно измерить любым способом, известным в данной области техники, например, как описано в примерах.

[0283] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой

человека, примата, отличного от человека (например, африканских зеленых мартышек, яванских макаков, макак-резусов и т. д.), млекопитающих, живущих на ферме, охотничьих млекопитающих или домашних млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом-человеком является грудной ребенок, ребенок ясельного возраста, ребенок младшего возраста, подросток, взрослый или человек старшего возраста. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание с участием Т-клеток и/или НК-клеток, которые экспрессируют CD94, например, CLPD-НК, лейкоз LGL, синдром Фелти, ревматоидный артрит, агрессивный лейкоз NK, миозит с тельцами-включениями, воспалительное заболевание кишечника или НК/Т-клеточная лимфома, такой как экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL или подкожная паникулитная TCL.

[0284] В некоторых вариантах осуществления введение антитела субъекту не приводит к синдрому лизиса опухоли у субъекта. Синдром лизиса опухоли можно измерить или диагностировать в соответствии с любым способом, известным в данной области техники, таким как система классификации Каиро-Бишопа для синдрома лизиса опухоли (*см., например, Cairo and Bishop (2004) Br J Haematol, 127(1):3-11.*)

[0285] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с CD94. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению истощает и/или снижает уровень НК-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет явные преимущества для пациента (например, пациента-человека), страдающего заболеванием или нарушением, таким как CLPD-НК, лейкоз LGL, ревматоидный артрит, синдром Фелти, агрессивный НК-лейкоз, IBM, IBD или НК-/Т-клеточная лимфома, такие как экстранодальная НК-/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL, подкожная паникулитная TCL или другие заболевания, связанные с LGL, Т-клетками и/или НК-клетками. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению имеет лучшую переносимость и меньше побочных эффектов по сравнению с первой и второй линией терапии заболевания или нарушения (например, CLPD-НК, лейкоз LGL, синдром Фелти, ревматоидный артрит, агрессивный лейкоз NK, миозит с тельцами-включениями, воспалительное заболевание кишечника или НК/Т-клеточная лимфома, такая как экстранодальная НК/Т-клеточная

лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK -), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL или TCL взрослых), такие как химиотерапия, например, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон; трансплантация стволовых клеток; спленэктомия; алектумаб; бевацизумаб; пралатрексат; авелумаб; ингибиторы протеасом, такие как карфилзомиб и бортезомиб; ингибиторы HDAC, такие как ромидепсин, белиностаг и вориностаг; и конъюгаты антитело-лекарственное средство, такие как брентуксимаб ведотин. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению демонстрирует более избирательное истощение болезнетворных клеток, например, NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, по сравнению с современными неселективными методами лечения, такими как химиотерапия, например, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон; трансплантация стволовых клеток; спленэктомия; алектумаб; бевацизумаб; пралатрексат; авелумаб; ингибиторы протеасом, такие как карфилзомиб и бортезомиб; ингибиторы HDAC, такие как ромидепсин, белиностаг и вориностаг; и конъюгаты антитело-лекарственное средство, такие как брентуксимаб ведотин. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу уменьшения количества или истощения NK-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94, у субъекта-человека при введении молекулы (например, антитела по настоящему изобретению), которая связывается с белком на клеточной поверхности на NK-клетках и/или Т-клетках, таким как CD94, и которая содержит (а) область, которая специфически связывается с мишенью, и (b) Fc-область иммуноглобулина.

[0286] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, дополнительно включают введение субъекту полипептида II-2, например, терапевтического полипептида II-2. Полипептиды II-2, например, терапевтические полипептиды II-2, подходящие для введения субъекту (например, субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, описанным в настоящем документе) в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, известны в данной области техники. Примеры полипептидов II-2 включают, без ограничения, алдеслейкин, интеркин-2 и неолейкин 2/15.

#### *A. Введение и схемы дозирования*

##### *(i) Пути введения*

[0287] В некоторых вариантах осуществления вводить, вводимый, введение и т.п. относятся к способам, которые используются для обеспечения доставки терапевтических или фармацевтических композиций в желаемое место биологического действия. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) для применения в любом из способов, предусмотренных в настоящем документе, можно вводить субъекту (например, человеку) любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное, интраназальное введение и введение

внутри очага поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению вводят путем внутривенной инфузии. Дозирование антитела по настоящему изобретению может осуществляться любым подходящим путем, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным.

*(ii) Схемы дозирования*

[0288] Антитело по изобретению для применения в любом из способов, представленных в настоящем документе, можно вводить субъекту с использованием различных схем или режимов дозирования, включая, помимо прочего, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию. Конкретная доза вводимых антител по настоящему изобретению будет варьироваться в зависимости от конкретной специфичности мишени, типа заболевания или нарушения, субъекта, а также характера и тяжести заболевания, физического состояния субъекта, схемы лечения (например, используется ли комбинированное терапевтическое средство) и выбранного пути введения. В некоторых вариантах осуществления доза антитела по настоящему изобретению может варьироваться от около 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта. Примерный режим дозирования антитела по настоящему изобретению влечет за собой введение антитела в многократных дозах в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере в течение шести месяцев.

[0289] Другие известные антитела к CD94 также могут быть использованы в способах, представленных в настоящем документе. Например, могут быть использованы следующие антитела к CD94: HP-3D9 (№ по каталогу LSBio LS-C134679-100; № по каталогу Abnova: MAB6947); 2I2; 131412 (№ по каталогу R&D Systems: MAB1058); 13B146 (№ по каталогу US Biological: 030068); 13B147 (№ по каталогу US Biological: 030069); 1H1 (№ по каталогу Abnova: MAB10543); 3G2 (№ по каталогу Biorbyt: orb69389); DX22 (№ по каталогу Biolegend 305502); REA113 (№ по каталогу Miltenyi Biotec: 130-098-967); KP43; EPR21003; AT13E3 (каталог ATGen: ATGA0487); HP-3B1; 12K45 и B-D49.

*В. Заболевания*

[0290] Существует 9 различных заболеваний, связанных с НК-/Т-клеточной лимфомой: экстранодальная НК-/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммунобластная TCL и TCL взрослых. См., например, Vajaj, 2019. НК-/Т-клеточная лимфома поражает различные органы, такие как кожа, желудочно-кишечный тракт, печень, селезенка, костный мозг. Симптомы НК-/Т-клеточной лимфомы включают увеличение шейных лимфатических узлов. Преимущественно способы, описанные в настоящем документе, можно

использовать, *например*, для уменьшения количества аномальных или патологических НК-клеток и/или Т-клеток (например, CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, CD4+ и CD8+ Т-клеток), которые экспрессируют CD94 с помощью таких механизмов, как ADCC, которые используют НК-клетки, по существу, используя патологические клетки для устранения друг друга.

[0291] Описанные в данном документе способы также можно использовать, *например*, для уменьшения количества аномальных или патологических НК- и/или Т-клеток, которые экспрессируют CD94 и ассоциированы с НК/Т-клеточной лимфомой, такой как экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома (TCL), TCL, ассоциированная с энтеропатией, кожная TCL, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK+), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALK-), периферическая TCL (не указано иное), ангиоиммуобластная TCL, TCL взрослых, мономорфная эпителиотропная кишечная TCL, эпидермотропная CD8+ кожная TCL, первичная кожная гамма/дельта TCL или подкожная панникулитная TCL, с помощью таких механизмов, как ADCC, в которых используются НК-клетки, по существу использующие патологические клетки для устранения друг друга.

[0292] Существует 3 различных заболевания, связанных с LGL: Т-клеточный лейкоз LGL (Т-LGL); хронические лимфопролиферативные заболевания НК-клеток (CLPD-NK, ранее NK-LGL); и агрессивные НК-клеточные лейкозы, такие как агрессивный лейкоз естественных киллеров (ANKL) и экстранодальный NKL назального типа (ENKL).

[0293] В дополнение к лейкозам НК или Т LGL клетки НК или LGL играют ключевую роль в развитии ревматоидного артрита (RA), синдрома Фелти, агрессивного лейкоза НК, миозита с тельцами-включениями (IBM), воспалительного заболевания кишечника (IBD) и других заболеваний. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений, в которых играют роль клетки LGL и НК, включают лейкоз LGL, ревматоидный артрит, синдром Фелти, агрессивный лейкоз НК, IBM и IBD. Преимущественно способы, описанные в настоящем документе, можно использовать, *например*, для уменьшения количества аномальных или патологических НК-клеток (*например*, клеток CLPD-NK, ANKL или ENKL) с помощью таких механизмов, как ADCC, которые используют НК-клетки, по существу, используя патологические клетки для устранения друг друга. Типичные описания симптомов этих заболеваний *см.*, *например*, в Lamy, et al, Blood, 2017 x Vol. 129, No. 9; Loughran Blood, VOI 82, NO 1 (July I), 1993: pp 1-14; Semenzato G, et al, Blood. 1997;89(1):256-260; и Bourgault-Rouxel, et al, Leuk Res.2008;32(1):45-48.

(i) CLPD-NK

[0294] Хронические лимфопролиферативные заболевания НК-клеток (CLPD-NK), также называемые лейкозом НК-LGL, хроническим лимфоцитозом НК-клеток, хроническим лимфопролиферативным заболеванием НК-LGL (LPD), пролиферативным заболеванием гранулярных лимфоцитов линии НК, лимфоцитозом LGL НК-клеток или

медленно растущим зернистым NK-клеточным LPD обычно характеризуются стойким (например, в течение 6 месяцев или более) увеличением количества NK-клеток в периферической крови (например,  $\geq 2 \times 10^9/\text{л}$ ).

[0295] Симптомы CLPD-NK включают различные цитопении, такие как нейтропения и анемия, утомляемость, лихорадку, ночную потливость, рецидивирующие инфекции, ревматоидный артрит, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия, поражения кожи, гематологические новообразования, васкулит, невропатия и аутоиммунные нарушения.

[0296] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой CLPD-NK, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов CLPD-NK у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов CLPD-NK у субъекта.

[0297] Симптомы CLPD-NK можно измерить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью лабораторных тестов для измерения анемии, нейтропении, общего анализа крови и/или магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии, пальпации или ультразвука (например, для определения гепатоспленомегалии), исследования костного мозга и проточной цитометрии. Описаны способы определения симптомов CLPD-NK, *например*, в Swerdlow, S.H. et al. (2016) Blood 127:2375-2390.

*(ii) Лейкоз LGL*

[0298] Лейкоз крупных гранулярных лимфоцитов (LGL) - это хроническое лимфопролиферативное заболевание, которое характеризуется хроническим повышением количества крупных гранулярных лимфоцитов (LGL) в периферической крови и называется T-клеточным лейкозом LGL.

[0299] Симптомы лейкоза LGL включают спленомегалию, симптомы группы В (например, системные симптомы, такие как лихорадка, ночная потливость и потеря веса), анемию, нейтропению и рецидивирующие инфекции. Ревматоидный артрит также часто встречается у людей с T-клеточным лейкозом LGL.

[0300] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой лейкоз LGL, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лейкоза LGL у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лейкоза LGL у субъекта.

[0301] Симптомы лейкоза LGL можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью лабораторных тестов для измерения анемии, нейтропении и других цитопений, общего анализа крови, магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии, пальпации или ультразвука (например,

для определения спленомегалии), исследования костного мозга и проточной цитометрии. Описаны способы определения симптомов лейкоза LGL, *например*, в Swerdlow, S.H. et al. (2016) Blood 127:2375-2390.

*(iii) Синдром Фелти*

[0302] Синдром Фелти представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся ревматоидным артритом, спленомегалией (например, воспалительной спленомегалией) и сниженным количеством нейтрофилов в крови. Симптомы синдрома Фелти включают болезненные, тугоподвижные и/или опухшие суставы, физические показатели, связанные с ревматоидным артритом, спленомегалию, нейтропению, инфекции, сухой кератоконъюнктивит, лихорадку, потерю веса, утомляемость, изменение цвета кожи, нарывы (например, язвы), гепатомегалию, анемию, тромбоцитопению, нарушение функции печени, увеличение лимфатических узлов и васкулит.

[0303] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой синдром Фелти, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов синдрома Фелти у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов синдрома Фелти у субъекта. Симптомы синдрома Фелти включают, помимо прочего, воспаление суставов, боль в суставах и спленомегалию.

[0304] Симптомы синдрома Фелти можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью лабораторных тестов для измерения анемии, нейтропении, тромбоцитопении и других цитопений, общего анализа крови, магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии или ультразвукового исследования (например, для определения спленомегалии и/или гепатомегалии), лабораторные тесты на аномальную функцию печени, пальпацию для определения спленомегалии и/или гепатомегалии, проточную цитометрию, показатель активности заболевания-28 (DAS-28, *например*, используемый для мониторинга симптомов ревматоидного артрита), и DAS-28 со скоростью оседания эритроцитов (СОЭ).

*(iv) Ревматоидный артрит*

[0305] Ревматоидный артрит является аутоиммунным заболеванием, которое в первую очередь поражает суставы, но также может поражать другие органы и может быть связано с сердечно-сосудистыми заболеваниями, остеопорозом, интерстициальными заболеваниями легких, инфекциями, раком, усталостью и депрессией. Симптомы ревматоидного артрита включают опухшие, болезненные и горячие суставы, воспаление суставов, боль в суставах, тугоподвижность суставов, спленомегалию, ревматоидные узелки (например, в коже), некротические гранулемы, васкулит, гангренозную пиодермию, синдром Свита, лекарственные реакции, узловатую эритему, панникулезную долю, атрофию кожи пальцев, эритему ладоней, ломкость кожи, диффузную очаговую алопецию, фиброз легких, синдром Каплана, экссудативный плеврит, атеросклероз,

инфаркт миокарда, инсульт, перикардит, эндокардит, левожелудочковую недостаточность, вальвулит, фиброз сердца и/или кровеносных сосудов, анемию, повышенное количество тромбоцитов, низкий уровень лейкоцитов, почечный амилоидоз, эписклерит, склерит, сухой кератоконъюнктивит, кератит, потерю зрения, проблемы с печенью, периферическую невропатию, множественный мононеврит, синдром запястного канала, миелопатию, атланто-осевой подвывих, смещение позвонков, утомляемость, субфебрилитет, недомогание, утреннюю скованность, потерю аппетита, потерю веса, остеопороз, рак (например, лимфому, рак кожи) и периодонтит.

[0306] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов ревматоидного артрита у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов ревматоидного артрита у субъекта.

[0307] В некоторых вариантах осуществления симптомы и статус заболевания/прогрессирование ревматоидного артрита измеряют в соответствии с Критериями классификации ревматоидного артрита ACR/EULAR 2010 г. (см., например, Aletaha et al., (2010) *Annals of Rheumatic Diseases*, 69(9):1580-8). Симптомы ревматоидного артрита также можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью лабораторных тестов для измерения скорости оседания эритроцитов, С-реактивного белка, ревматоидного фактора, антител к цитруллинированному белку, анемии и других цитопений, повышенного количества тромбоцитов, низкий уровень лейкоцитов, полный анализ крови, почечный амилоидоз, медицинская визуализация, такая как рентген, МРТ, КТ, УЗИ (например, ультразвуковое исследование с использованием высокочастотного датчика; доплеровское УЗИ), проточная цитометрия, оценка активности заболевания-28 (DAS-28) и DAS-28 со скоростью оседания эритроцитов (СОЭ).

*(v) Агрессивный лейкоз NK*

[0308] Агрессивный NK-клеточный лейкоз - это агрессивное заболевание с системной пролиферацией NK-клеток и быстро ухудшающимся клиническим течением. Агрессивный NK-лейкоз также может называться агрессивной NK-клеточной лимфомой. Симптомы агрессивного NK-клеточного лейкоза включают конституциональные симптомы (например, недомогание, потеря веса, утомляемость), гепатоспленомегалию, лимфаденопатию, коагулопатию, гемофагоцитарный синдром, полиорганную недостаточность, инфекции, такие как вирус Эпштейна-Барр, аллергические реакции (например, аллергические реакции к укусам насекомых, таких как укусы комаров), что может привести к некрозу и системным симптомам, таким как лихорадка, увеличение лимфатических узлов, боль в животе, диарея и анафилаксия.

[0309] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в

настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой агрессивный лейкоз NK-клеток, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов агрессивного лейкоза NK-клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов агрессивного лейкоза NK-клеток у субъекта.

[0310] Симптомы агрессивного лейкоза NK можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью лабораторных тестов, например, для измерения анемии, нейтропении и других цитопений, общего анализа крови и/или магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии, пальпации или ультразвука (например, для определения спленомегалии), исследования костного мозга и проточной цитометрии. Описаны способы определения симптомов агрессивного лейкоза NK, *например*, в Swerdlow, S.H. et al. (2016) Blood 127:2375-2390.

*(vi) Миозит с тельцами-включениями*

[0311] Миозит с тельцами-включениями (IBM), также называемый спорадическим миозитом с тельцами-включениями, представляет собой воспалительное заболевание мышц, характеризующееся аутоиммунными и дегенеративными процессами, которые приводят к прогрессирующей слабости и истощению дистальных и/или проксимальных мышц. Как правило, IBM характеризуется инвазией иммунных клеток в мышечные ткани. В некоторых случаях у пациентов с IBM повышен уровень креатинкиназы в крови. Симптомы IBM включают прогрессирующую мышечную слабость, мышечную атрофию/атрофию, частые спотыкания и падения, трудности с манипулированием пальцами, свисание стопы, ограничение подвижности, нарушение равновесия, мышечную боль, дисфагию и утомляемость.

[0312] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой IBM, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов IBM у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов IBM у субъекта.

[0313] Симптомы IBM можно измерить любым методом, известным в данной области техники, таким как биопсия мышц, анализы крови (например, для измерения креатинкиназы), исследования электромиографии (ЭМГ), анализы крови для измерения антител к NT5C1A, проточная цитометрия и инструменты оценки активности миозита, включая, помимо прочего, показатель активности миозита для лечения (MITAX) и визуальные аналоговые шкалы оценки активности заболевания миозитом (MYOACT).

*(vii) Воспалительное заболевание кишечника*

[0314] Воспалительное заболевание кишечника (IBD) относится к классу воспалительных состояний толстой и тонкой кишки. Типы IBD включают язвенный колит и болезнь Крона. Симптомы IBD включают диарею, лихорадку, усталость, боль в животе,

спазмы в животе, кровь в стуле, снижение аппетита и потерю веса.

[0315] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, заболевание или нарушение представляет собой IBD, и введение антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов IBD у субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта после введения антитела приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов IBD у субъекта.

[0316] Симптомы IBD могут быть измерены любым методом, известным в данной области техники, таким как лабораторные анализы крови на анемию, другие цитопении или инфекции, анализы кала на скрытую кровь, колоноскопия, гибкая сигмоидоскопия, эндоскопия верхних отделов, капсульная эндоскопия, энтероскопия с баллоном, рентген, КТ, МРТ, УЗИ и проточная цитометрия.

### *III. Фармацевтические составы*

[0317] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, композиция или фармацевтический состав относятся к биологически активному соединению (например, антителу согласно настоящему изобретению), необязательно смешанному с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым химическим компонентом, таким как, помимо прочего, носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие вещества, суспендирующие агенты, загустители, вспомогательные вещества и т.п.

[0318] Фармацевтические композиции, фармацевтические составы и/или композиции любых антител по настоящему изобретению для применения в любом из способов, описанных в настоящем документе, могут быть получены путем смешивания такого антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных составов или водных растворов.

[0319] Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как

натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в данном документе дополнительно включают внутритканевые диспергирующие агенты, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

[0320] Состав в данном документе может также содержать более одного активного ингредиента, если это необходимо для конкретного показания (например, заболевания или нарушения), подлежащего лечению, предпочтительно с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга.

[0321] Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в 16-м издании Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980).

[0322] Могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело или иммуноконъюгат, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

[0323] Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

#### ***IV. Наборы и готовые изделия***

[0324] В другом аспекте изобретения набор или готовое изделие, содержащие материалы, подходящие для способов, представленных в настоящем документе, например, для лечения заболеваний или нарушений, описанных выше, уменьшения количества НК-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта или индуцирования активности ADCC у субъекта. Набор или готовое изделие может содержать контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для внутривенного введения и т. д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией эффективна для способов,

предусмотренных в настоящем документе, например, для лечения описанных выше заболеваний или нарушений, уменьшения количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта или индуцирования активности ADCC у субъекта, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело по настоящему изобретению. На этикетке или листке-вкладыше указано, что композиция используется для способов, представленных в настоящем документе, например, для лечения заболеваний или нарушений, описанных выше, уменьшения количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта или индуцирования активности ADCC у субъекта. Кроме того, набор или готовое изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит антитело по настоящему изобретению; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, при этом композиция содержит дополнительное терапевтическое средство. Набор или готовое изделие в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно содержать листок-вкладыш, указывающий, что композиции могут быть использованы для лечения конкретного заболевания или нарушения, например, как описано в настоящем документе, для уменьшения количества NK-клеток и/или Т-клеток периферической крови, которые экспрессируют CD94, у субъекта или индуцирования активности ADCC у субъекта. Альтернативно или дополнительно набор или изделие производства может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера или раствор декстрозы. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[0325] Следующее описание представлено для того, чтобы позволить специалисту в данной области техники создавать и использовать различные варианты осуществления. Описания конкретных устройств, методов и приложений приведены только в качестве примеров. Различные модификации примеров, описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники, и определенные в данном документе общие принципы могут быть применены к другим примерам и заявкам без отклонения от сущности и объема различных вариантов осуществления. Таким образом, различные варианты осуществления не предназначены для ограничения описанными в данном документе и показанными примерами, но должны соответствовать объему, соответствующему формуле изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### ***Пример 1. Получение и оценка антител к CD94***

[0326] В этом примере описывается получение и характеристика антител,

специфичных по отношению к CD94 человека.

#### Материалы и способы

##### *Получение и скрининг антител к CD94*

[0327] Четырехнедельных трансгенных мышей ATX-Gx Alloy (мыши, которые продуцируют человеческие антитела) иммунизировали подкожно с помощью С-концевого His-меченого CD94 в течение пяти недель, с одной бустер-иммунизацией антигеном в неделю. Титры антител в сыворотке мышей оценивали до и после бустер-иммунизации с помощью ИФА и проточной цитометрии. Мышей с самым высоким титром антител в сыворотке отбирали в качестве источника В-клеток для образования гибридом.

[0328] Перед слиянием клеток мышам вводили одну дополнительную бустерную дозу антигена CD94-His. Затем мышей умерщвляли и собирали их селезенки. Клетки селезенки и клетки миеломы SP2/0-Ag14 смешивали, а затем индуцировали слияние путем инкубации при 37°C в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) или электропорации. Затем клетки собирали и высевали в 96-луночные планшеты с ограниченным разведением, чтобы получить одну клетку на лунку. Затем клетки обрабатывали средой с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (НАТ) и отбирали в течение более 2 недель в культуре.

[0329] Супернатант гибридомы подвергали скринингу с использованием ИФА и проточной цитометрии для выявления кандидатов, специфичных в отношении CD94. Для ИФА антиген CD94-His иммобилизовали на планшетах и 100 мкл каждого супернатанта инкубировали с антигеном. Флуоресцентно меченные вторичные антитела использовали для обнаружения антител, захваченных на планшете ИФА, и положительные совпадения подтверждали анализом связывания антител с первичными НК-клетками человека с использованием проточной цитометрии. Перекрестную реактивность CD94 яванского макака оценивали по связыванию антител с клетками BaF3, экспрессирующими CD94 яванского макака, с использованием проточной цитометрии.

[0330] Верификацию последовательностей VH и VL проводили с использованием стандартной экстракции РНК из гибридом с последующей обратной транскрипцией РНК в кДНК и ПЦР с использованием специфических праймеров Alloy ATC-Gx.

##### *Образцы здоровых доноров и пациентов*

[0331] Свежие лейкоцитарные пленки здоровых доноров были получены из Стэнфордского центра крови. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли с помощью разделения на фиколл-паке (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс) и криоконсервировали в среде для замораживания клеток от Vambanker (Bulldog-Bio, Портсмут, Нью-Гэмпшир). Вкратце, лейкоцитарную пленку разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS) в соотношении 1:1 с последующим наслоением разбавленной лейкоцитарной пленки и центрифугированием при 760 g в фиколле. Слой PBMC выделяли и промывали в PBS перед дальнейшим анализом. Лейкоциты периферической крови (PBL) выделяли путем лизиса эритроцитов.

##### *Анализ аффинности антител*

[0332] РВМС здорового донора высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку, инкубировали с Fc-блоком человека (Biolegend) и красителем жизнеспособности клеток (Thermo Fisher) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Клетки однократно промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG low FBS). Антитела к CD94 в концентрациях от 100 нМ до 0,046 нМ, 1:3-кратные разведения инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки промывали и инкубировали с козьим IgG против мышинового Fcy-специфического вторичного антитела AF647 или козьим (Fab)<sub>2</sub>-фрагментом против человеческого Fcy-специфического вторичного антитела AF647 (иммунологическое исследование Джексона), антителом к CD3, меченым тихоокеанским синим, и антителом к CD56, меченым FITC (Biolegend), в течение 30 минут на льду и защищали от света. После инкубации клетки окончательно промывали буфером FACS перед количественным определением на Cytoflex (Beckman Coulter). Сбор всех данных и компенсацию флуоресценции выполняли с помощью CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, Джорджия). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения FlowJo. NK-клетки идентифицировали путем гейтирования лимфоцитов при прямом и боковом рассеянии с последующим исключением дублетов и мертвых клеток и гейтированием популяции CD3-CD56+. Экспрессию CD94 затем количественно определяли в популяции CD3-CD56+ NK-клеток. Кривые титрования антител и EC50 были построены с использованием Graphpad Prism.

*Анализ перекрестной реактивности антител к CD94 яванского макака*

[0333] Клетки НЕК293, экспрессирующие CD94 яванского макака, высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку, инкубировали с красителем жизнеспособности клеток (Thermo Fisher) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Клетки однократно промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG низким FBS). Супернатанты гибридом, антитела к CD94 и изотипические контроли инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки промывали и инкубировали с козьим IgG-специфическим вторичным антителом AF647 против мышинового Fcy или козьим (Fab)<sub>2</sub>-фрагментом против человеческого Fcy-специфического вторичного антитела AF647 (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут на льду и защищали от света. После инкубации клетки окончательно промывали буфером FACS перед количественным определением на Cytoflex (Beckman Coulter). Сбор всех данных и компенсацию флуоресценции выполняли с помощью CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, Джорджия). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения FlowJo. Клетки НЕК293 идентифицировали путем гейтирования основной клеточной популяции с использованием прямого и бокового рассеяния с последующим исключением дублетов и мертвых клеток. Затем в этой популяции количественно определяли экспрессию CD94. Гистограммы MFI были созданы с использованием Graphpad Prism.

*Анализ блокирования HLA-E*

[0334] РВМС здорового донора высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку, инкубировали с Fc-блоком человека (Biolegend) и красителем

жизнеспособности клеток (Thermo Fisher) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Клетки однократно промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG низким FBS). Антитела к CD94 в концентрациях EC80, инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду и защищали от света. После инкубации с антителами к CD94 клетки промывали и инкубировали с тетрамером HLA-E PE (Creative Biolabs), антителами к CD3, мечеными тихоокеанским синим, и антителами к CD56, мечеными FITC (Biolegend), в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки окончательно промывали буфером FACS перед количественным определением на Cytoflex (Beckman Coulter). Сбор всех данных и компенсацию флуоресценции выполняли с помощью CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, Джорджия). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения FlowJo. NK-клетки идентифицировали путем гейтирования лимфоцитов при прямом и боковом рассеянии с последующим исключением дублетов и мертвых клеток и гейтированием популяции CD3-CD56+. Экспрессию HLA-E затем количественно определяли в популяции CD3-CD56+ NK-клеток. Процент блокировки рассчитывали как  $100 - ((\text{процент положительных результатов HLA-E для антитела к CD94}) / (\text{процент положительных результатов HLA-E для изотипа})) * 100$ .

#### *Анализ конкуренции антител*

[0335] РВМС здорового донора высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку, инкубировали с Fc-блоком человека (Biolegend) и красителем жизнеспособности клеток (Thermo Fisher) в течение 30 минут на льду и защищали от света. Клетки однократно промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG низким FBS). Неконъюгированные антитела к CD94 в концентрациях EC80, антитела CD3-FITC- и CD56-PE и APC-меченые антитела к CD94 инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду и защищали от света. Затем клетки окончательно промывали буфером FACS перед количественным определением на Cytoflex (Beckman Coulter). Сбор всех данных и компенсацию флуоресценции выполняли с помощью CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, Джорджия). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения FlowJo. NK-клетки идентифицировали путем гейтирования лимфоцитов при прямом и боковом рассеянии с последующим исключением дублетов и мертвых клеток и гейтированием популяции CD3-CD56+. APC к CD94 затем количественно определяли в популяции CD3-CD56+ NK-клеток. Все кривые титрования и EC50 были построены с использованием Graphpad Prism.

#### *Анализ интернализации антител*

[0336] РВМС здорового донора высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку в RPMI с 10% IgG низким FBS, инкубировали с Fc-блоком человека (Biolegend) в течение 10 минут при комнатной температуре. Неконъюгированные антитела к CD94 инкубировали с клетками в концентрациях EC80 при 4°C и 37°C в течение от 30 минут до 24 часов. Клетки один раз промывали буфером FACS (PBS с 2% IgG низким FBS) и хранили на льду для оставшейся процедуры. Специфические антитела козы к Fc $\mu$  мыши инкубировали с клетками в течение 30 минут

на льду и защищали от света. Затем клетки один раз промывали и количественно определяли экспрессию CD94 на Cytoflex. Сбор всех данных и компенсацию флуоресценции выполняли с помощью CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, Джорджия). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения FlowJo. NK-клетки идентифицировали путем гейтирования лимфоцитов при прямом и боковом рассеянии с последующим исключением дублетов и мертвых клеток и гейтированием популяции CD3-CD56+. APC к CD94 затем количественно определяли в популяции CD3-CD56+ NK-клеток. Процентное снижение MFI рассчитывали путем вычисления разницы в MFI между 0,5 и 24 часами при 37°C и умножения на 100.

*Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности*

[0337] Приблизительно  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  свежих или замороженных РВМС высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном, обработанные тканевой культурой, в RPMI с 10% FBS с низким содержанием IgG. Клетки инкубировали в течение ночи в концентрации  $10^1$ - $10^6$  мкг/мл в 10-кратных разведениях изотипического контрольного антитела IgG1 человека или фукозилированного антитела 1E4 и антитела 18H3-K1F. Затем клетки окрашивали флуоресцентно мечеными антителами к CD3, CD56 и CD16 для идентификации оставшихся NK-клеток (см. анализ проточной цитометрии). На проточном цитометре было собрано не менее 10 000 событий в популяции лимфоцитов. Процент оставшихся NK/лейкемических клеток рассчитывали путем нормализации абсолютного подсчета по количеству клеток в условиях, обработанных изотипом. IC50 определяли с помощью GraphPad Prism.

Результаты

[0338] Антитела к CD94 генерировали с использованием стандартной методики гибридом, как описано *выше*. Вкратце, трансгенных мышей ATX-Gx Alloy иммунизировали С-концевым His-меченым CD94 в течение пяти недель. В-клетки от мышей с самым высоким титром сывороточных антител через пять недель использовали для получения гибридом. Гибридомы подвергали скринингу с помощью ИФА для выявления кандидатов, специфичных в отношении CD94.

[0339] Положительные попадания подтверждали путем оценки связывания с NK-клетками человека с помощью анализа проточной цитометрии. Связывание клонов антитела к CD94 с первичными NK-клетками человека оценивали с помощью анализа проточной цитометрии. Супернатанты гибридом антител к CD94 использовали для проверки связывания клонов антител к CD94. Коммерчески доступное антитело к CD94, HP-3D9, и несколько контрольных изотипов IgG также тестировали на связывание с NK-клетками.

[0340] Аффинность клонов антител также оценивали анализом проточной цитометрии. На **фиг. 1** показана кривая титрования, полученная для клона антитела к CD94 18H3. Антитело к CD94 18H3 показало аффинность 2,6 нМ на первичных NK-клетках человека. Аффинности, определенные для других антител к CD94, перечислены на **фиг. 11**. Как показано на **фиг. 2**, скрининг супернатанта гибридомы показал, что 18H3,

1M4 и 1E4 связываются с первичными НК-клетками человека, как было измерено с помощью проточной цитометрии.

[0341] Супернатанты гибридомы антитела к CD94 также тестировали на перекрестную реактивность с CD94 яванского макака. Гибридомы подвергали скринингу на перекрестную реактивность к CD94 яванского макака с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих CD94 яванского макака, с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 3А**, этот анализ показал, что клоны 18H3, 1M4 и 1E4 перекрестно реагируют с CD94 яванского макака. Супернатант из клона 20F2 не давал перекрестной реакции с CD94 яванского макака, хотя и реагировал с CD94 человека. Также оценивали перекрестную реактивность коммерчески доступных антител к CD94. Как показано на **фиг. 3В**, ни одно из протестированных коммерчески доступных антител к CD94 (HP-3D9, HP-3B1, 131412, 12K45, DX22) не проявляло перекрестной реактивности с CD94 яванского макака.

[0342] Эти результаты показывают, что антитела к CD94 18H3, 1M4 и 1E4 связываются с эпитопом, который не является общим с антителами HP-3D9, HP-3B1, 131412, 12K45, DX22 и 20F2 (не коммерческими). Перекрестная реактивность антител 18H3, 1M4 и 1E4 свидетельствует о том, что они могут быть полезны для изучения токсичности яванского макака перед испытаниями фазы I на людях.

[0343] После проверки последовательности VH и VL определяли для проверенных клонов антител. В **таблице А** обобщены последовательности VH и VL для трех проверенных клонов антитела к CD94, 18H3, 1M4 и 1E4. Каркасные последовательности и последовательности CDR (выделены жирным шрифтом в **таблице А**) определяли с использованием схемы нумерации Kabat.

**Таблица А. Последовательности клонов антител к CD94**

Клон антитела	Тяжелая цепь	Легкая цепь
18H3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI <b>IYPGDS DTRYSPSFQGVII</b> SADKSIT TAFLQWSSLKASDTAMY <sup>Y</sup> CAR <b>PFDY</b> <b>GGSPGYFDY</b> WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC <b>RASQSIRSWLAWYQQKPGKAP</b> KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPD <sup>D</sup> FATYYC <b>QQ</b> <b>YNTFWTFGQGTKVEIK</b> (SEQ ID NO:20)
1M4	QLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGF TFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSI <b>SGSGDTTYCADSVKGRFTISRDNSK</b> NTLHLQLNSLRAEDTAVYYCAKNCY <b>GSGSYNHFDY</b> WGQGLVTVSS	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <b>KSSQSVLYSSNRMNYLAWYQ</b> QKPGQPPNLLIYWAST <b>TRESGVP</b> DRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYC <b>QQYYSIPLTFGGGTK</b>

	(SEQ ID NO:21)	VEIK (SEQ ID NO:22)
1E4	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSG FSLSTSDLCVSWIRQPPGKALEWLAL <b>IDWNDDKYYSTSLQ</b> TRLTISKDTSK NQVVLMTNMDPVDTATYYCARTI <b>AAAGPYDAFDI</b> WGQGMVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIVMTQSPDSLSVSLGERATINC <b>KSSQSVLYGSNNKN</b> YLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAST <b>TRKSGVP</b> DRFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLQAED</b> VAVYYC <b>QEYYSLRFT</b> FGPGTK VDIK (SEQ ID NO:24)

[0344] Аттестованные антитела к CD94 дополнительно оценивали на предмет их способности (или ее отсутствия) блокировать связывание HLA-E. HLA-E является лигандом гетеродимеров CD94/NKG2A и играет решающую роль в ингибировании активности NK и CD8+ Т-клеток при связывании с CD94/NKG2A. Без привязки к теории считается, что взаимодействие между HLA-E и CD94/NKG2A может приводить к активации и пролиферации клеток-мишеней. Таким образом, выгодно, чтобы антитело-кандидат к CD94 не блокировало взаимодействие CD94:HLA-E в условиях заболевания.

[0345] Блокирование HLA-E клонами антител к CD94 и коммерчески доступными антителами к CD94 оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 4**, антитела 18H3 и 1E4 не блокировали связывание HLA-E. Блокирование HLA-E более чем на 40% наблюдалось для коммерчески доступных антител к CD94, в то время как для антител к CD94 наблюдалось 0% блокирование. Поскольку уровни экспрессии CD94 варьируются от тусклых (~ 10 000 рецепторов) до ярких (> 100 000 рецепторов), мы предполагаем, что если антитело блокирует более 20% связывания HLA-E, его можно рассматривать как антитело, блокирующее лиганд. В целом этот анализ на блокирование HLA-E демонстрирует, что антитела 18H3 и 1E4 не блокируют взаимодействие CD94 с HLA-E, в то время как коммерчески доступные антитела к CD94 блокируют это взаимодействие.

[0346] Были проведены конкурентные анализы, чтобы определить, связываются ли вновь идентифицированные антитела с общими эпитопами с собой и существующими антителами. Антитела к CD94 18H3, 1M4 и 1E4 анализировали на предмет конкурирования друг с другом, а также с коммерчески доступными антителами. Как показано на **фиг. 5A-5B**, антитело 18H3 связывается с уникальным эпитопом. 18H3 лишь частично конкурировало с HP-3D9 и не конкурировало с антителами DX22, HP-3B1, 131412, 12K45, 1E4 и 1M4. Таким образом, антитело 18H3 связывается с эпитопом, который не является общим с коммерчески доступными антителами.

[0347] Точно так же антитело 1M4 не конкурировало с коммерчески доступными

антителами. Как показано на **фиг. 6А-6В**, 1М4 конкурировало с антителом 1Е4, но не конкурировало с DX22, 131412, HP-3D9, 12К45 и HP-3В1.

[0348] Антитело 1Е4 не конкурировало с четырьмя из пяти протестированных коммерчески доступных антител к CD94. Как показано на **фиг. 7**, 1Е4 частично конкурировало с 12К45, но не конкурировало с HP-3D9, DX22, 131412 и HP-3В1.

[0349] Анализ интернализации антител проводили для оценки интернализации рецепторов CD94 при связывании антителом к CD94. В этом анализе пороговое значение выше 50% будет считаться высокой степенью интернализации. Не желая привязываться к теории, считается, что низкий уровень интернализации был бы полезен для антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), поскольку рецептор CD94 будет сохраняться на клеточной поверхности и поддерживать высокую плотность рецепторов для эффекторных клеток для выполнения ADCC. Результаты, изображенные на **фиг. 8А-8В**, показывают, что рецептор CD94 интернализуется при связывании с коммерческими антителами к CD94, но не при связывании с антителами 18Н3, 1М4 и 1Е4. Антитела 18Н3, 1М4 и 1Е4 не интернализировались выше 50% при связывании с CD94. Напротив, снижение MFI на 54%, 56%, 24%, 32%, 18% наблюдалось для HP-3D9, DX22, 18Н3, 1М4 и 1Е4, соответственно, по сравнению с 0,5 часа до 24 часов при 37°C.

[0350] Чтобы проверить способность антител к CD94 индуцировать ADCC NK-клеток, анализ ADCC проводили с использованием PBMC здоровых доноров. Для этого анализа антитело 18Н3 было получено в клетках Expi-CHO, культивируемых в присутствии кифунензина, мощного ингибитора фермента маннозидазы I для получения нефукозилированного антитела, имитирующего 18Н3-KIF. Фукозилированное антитело 1Е4 также тестировали в отношении ADCC. Как показано на **фиг.9А-9В**, частично нефукозилированные человеческие IgG1 18Н3 и фукозилированные 1Е4 истощенные человеческие NK-клетки в пуле PBMC здоровых доноров в культуре ex vivo после 24 часов инкубации. Истощение NK-клеток человеческим IgG1 18Н3 и 1Е4 зависело от концентрации. Значение IC50 для 18Н3-KIF было определено как 0,02 мкг/мл, в то время как значение IC50 для антитела 1Е4 не было определено.

[0351] Наконец, способность антитела 18Н3 индуцировать ADCC лейкозных клеток человека оценивали с помощью анализа ADCC с использованием клеток пациентов с хроническим лимфопролиферативным заболеванием NK-клеток (NK). Для этого анализа антитело 18Н3 было получено в клетках Expi-CHO, культивируемых в присутствии кифунензина, для получения нефукозилированного антитела, имитирующего 18Н3-KIF. Как показано на **фиг. 10**, частично нефукозилированное 18Н3 IgG1 человека истощало лейкозные клетки CLPD-NK в пуле PBMC пациента с CLPD-NK в культуре ex vivo после 24 часов инкубации. Антитело 18Н3 истощало лейкозные клетки CLPD-NK человека зависимым от концентрации образом с IC50 0,059 мкг/мл. Это истощение было избирательным, поскольку никакие другие типы клеток не затрагивались.

[0352] На **фиг. 11** обобщены характеристики и функциональная оценка антител к CD94 по сравнению с коммерчески доступными антителами, как описано выше.

### ***Пример 2. Характеристика антитела к CD94 ATX-130***

[0353] В этом примере описывается характеристика антитела, специфичного к CD94 человека.

#### *Материалы и способы*

[0354] Материалы и методы, используемые в этом эксперименте, подробно описаны ниже. Если не указано иное, донорские образцы и первичные клетки готовили, как описано в примере 1. Если не указано иное, анализы аффинности антител, анализ блокирования HLA-E, анализ конкуренции антител, анализ интернализации антител и анализ зависимой от антител клеточной цитотоксичности выполняли, как описано в примере 1.

#### *Интерферон гамма ИФА*

[0355] Приблизительно  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  свежих или замороженных РВМС высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном, обработанные тканевой культурой, в RPMI с 10% FBS с низким содержанием IgG. Клетки инкубировали в течение ночи только в hATX-130, mATX-130, изотипическом контроле IgG1 человека и среде (1, 5 и 10 мкг/мл). Супернатанты клеточных культур собирали через 24 часа после инкубации и оценивали секрецию IFN-gamma с использованием набора для ИФА Quantikine для человеческого IFN-gamma (R&D systems, Миннеаполис, Миннесота).

#### *Результаты*

[0356] Четырехнедельных трансгенных мышей ATX-Gx Alloy (мыши, которые продуцируют человеческие антитела) иммунизировали подкожно с помощью C-концевого His-меченого CD94 в течение пяти недель, с одной бустер-иммунизацией антигеном в неделю. Титры антител в сыворотке мышей оценивали до и после бустер-иммунизации с помощью ИФА и проточной цитометрии. Мышей с самым высоким титром сывороточных антител отбирали для сбора селезенки. В-клетки выделяли из селезенки, а затем репертуары обработанных V-генов клонировали в векторы фаговой библиотеки. Затем фаговую библиотеку подвергали скринингу на наличие высокоаффинных связывателей против иммобилизованного антигена CD94 в течение 2-3 циклов с последующим элюированием фагов-кандидатов. Элюированный фаг использовали для заражения бактерий, а ДНК секвенировали для идентификации последовательностей VL и VH. Последовательности VL и VH переформатировали на IgG1 человека для получения антител к CD94 человека.

[0357] Аффинность клонов антител оценивали анализом проточной цитометрии. Нефукозилированное антитело, имитирующее ATX-130-KIF, получали путем культивирования клеток Eхр1-СНО, культивируемых в присутствии кифунензина, мощного ингибитора фермента маннозидазы I. На **фиг. 12** показаны кривые титрования, полученные для клонов антител к CD94 ATX-130 и ATX-130-KIF. Антитело к CD94 ATX-130 показало аффинность 0,6 нМ на первичных NK-клетках человека. ATX-130-KIF показало аффинность 1 нМ к первичным NK-клеткам яванского макака, 1,4 нМ к хроническому лимфопролиферативному заболеванию NK-клеток (CLPD-NK) и 3 нМ к

клеткам лейкоза Т-больших гранулярных лимфоцитов (Т-LGLL). Таким образом, АТХ-130 и АТХ-130-KIF обладают сходной аффинностью связывания с первичными НК-клетками человека, НК-клетками яванского макака, CLPD-НК-клетками и клетками Т-LGLL.

[0358] Аффинность клона антитела АТХ-130 к гомодимеру и гетеродимеру CD94 также оценивали с помощью анализа проточной цитометрии. На **фиг. 13** показаны кривые титрования, полученные для клона антитела к CD94 АТХ-130. Клон антитела к CD94 АТХ-130 показал аффинность 0,3 нМ на клетках ВаF3, сверхэкспрессирующих гомодимер CD94 (верхняя панель). Клон антитела к CD94 АТХ-130 показал аффинность 0,8 нМ и 1,8 нМ на клетках ВаF3, сверхэкспрессирующих либо гетеродимер CD94/NKG2A, либо CD94/NKG2C, соответственно (нижние панели). Эти результаты показывают, что АТХ-130 связывается с гомодимером CD94, CD94/NKG2A и гетеродимером CD94/NKG2C клетками ВаF3 с аналогичной аффинностью.

[0359] Для оценки агонистического или антагонистического действия АТХ-130 на гетеродимеры CD94/NKG2A и NKG2C выполняли иммуоферментный анализ гамма-интерферона. Как показано на **фиг. 14**, НК-клетки не секретировали IFN-гамма в присутствии АТХ-130 с неактивным мышинным Fc (mАТХ-130), что свидетельствует о том, что связывание только с CD94 в отсутствие активного Fc человека не активирует нижестоящую передачу сигналов NKG2A и NKG2C. Таким образом, антитело АТХ-130 не является агонистом или антагонистом на CD94/NKG2A и NKG2C на НК-клетках.

[0360] Были проведены конкурентные анализы, чтобы определить, связываются ли вновь идентифицированные антитела с общими эпитопами с существующими антителами. Антитело к CD94 АТХ-130 анализировали на предмет конкурирования с коммерчески доступными антителами к CD94. Как показано на **фиг. 15**, АТХ-130 связывается с уникальным эпитопом. АТХ-130 не конкурировало с НР-3D9, DX22, 131412, 12K45 или НР-3В1. Таким образом, антитело АТХ-130 связывается с эпитопом, который не является общим с коммерчески доступными антителами.

[0361] После проверки последовательности VH и VL определяли для проверенных клонов антител. В таблице 2 обобщены последовательности VH и VL для проверенного клона антитела к CD94, АТХ-130. Каркасные последовательности и последовательности CDR (см. таблицу 1) определяли с использованием схемы нумерации Kabat.

[0362] Проверенное антитело к CD94 дополнительно оценивали на предмет его способности (или ее отсутствия) блокировать связывание HLA-E, как описано в примере 1. Блокирование HLA-E антителом к CD94 АТХ-130-KIF и изотипическим контролем оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 16**, насыщающие концентрации АТХ-130-KIF не блокировали связывание HLA-E.

[0363] Анализ интернализации антител проводили для оценки интернализации рецепторов CD94 при связывании с антителом к CD94, как описано в примере 1. Как показано на **фиг. 17**, рецептор CD94 не интернализуется до 24 часов при 37°C, когда он связан с неконъюгированным АТХ-130.

[0364] Селективность связывания нефукозилированных антител, обработанных KIF (ATX-130-KIF), оценивали с помощью анализа проточной цитометрии на иммунных клетках здоровых людей, яванских макаков и пациентов с LGLL. Как показано на **фиг. 18**, ATX-130-KIF не связывается с моноцитами, CD4<sup>+</sup> Т-клетками или В-клетками в нормальных PBMC человека и яванского макака и PBMC пациентов с лейкозом LGL. Небольшие подмножества CD8<sup>+</sup> Т-клеток распознавались ATX-130-KIF во всех трех типах образцов. Таким образом, ATX-130-KIF селективно связывается с нормальными и LGLL NK-клетками из всех трех типов образцов.

[0365] Чтобы проверить способность антител к CD94 индуцировать ADCC NK-клеток, анализ ADCC проводили с использованием PBMC здоровых людей-доноров. Для этого анализа нефукозилированное антитело к CD94 (ATX-130-KIF) тестировали на ADCC в NK-клетках, В-клетках, Т-клетках и моноцитах человека. Как показано на **фиг. 19**, ATX-130-KIF истощает человеческие NK-клетки в пуле PBMC здоровых доноров в культуре *ex vivo* после 24 часов инкубации, тогда как человеческие В-клетки, Т-клетки и моноциты не затрагиваются. Истощение NK-клеток ATX-130-KIF зависело от концентрации. Значение IC<sub>50</sub> для ATX-130-KIF было определено как 0,8 нг/мл. Истощение более 50% NK-клеток наблюдалось при самой высокой концентрации *ex vivo*. Эффективность ATX-130 в отношении NK-клеток и сохранение других иммунных клеток предполагает, что эта молекула может проявлять высокую эффективность и благоприятный профиль токсичности *in vivo*.

[0366] Затем для проверки способности антител к CD94 индуцировать ADCC NK-клеток проводили анализ ADCC с использованием PBMC яванского макака. Для этого анализа нефукозилированное антитело к CD94 (ATX-130-KIF) тестировали на ADCC в NK-клетках, В-клетках, Т-клетках и моноцитах яванского макака. Как показано на **фиг. 20**, ATX-130-KIF истощает NK-клетки яванского макака в пуле PBMC яванского макака в культуре *ex vivo* после 24 часов инкубации, тогда как В-клетки, Т-клетки и моноциты яванского макака не затрагиваются. Истощение NK-клеток ATX-130-KIF зависело от концентрации. Значение IC<sub>50</sub> для ATX-130-KIF было определено как 0,3 нг/мл. Истощение более 50% NK-клеток наблюдалось при самой высокой концентрации *ex vivo*. Эффективность ATX-130 в отношении NK-клеток и сохранение других иммунных клеток предполагает, что эта молекула может проявлять высокую эффективность и благоприятный профиль токсичности *in vivo*.

[0367] Наконец, способность антитела ATX-130-KIF индуцировать ADCC лейкозных клеток человека оценивали с помощью анализа ADCC с использованием клеток пациентов с хроническим лимфопролиферативным заболеванием NK-клеток (CLPD-NK) и лейкозом Т-крупных гранулярных лимфоцитов (Т-LGLL). Как показано на **Фиг. 21**, антитело ATX-130-KIF истощало человеческие Т-LGLL и CLPD-NK лейкозные клетки зависимым от концентрации образом с IC<sub>50</sub> 0,2 нг/мл и 0,6 нг/мл соответственно. Истощение более 30% и 50% лейкозных клеток Т-LGLL и CLPD-NK наблюдалось при самой высокой концентрации *ex vivo* соответственно. Это истощение было

избирательным, поскольку никакие другие типы клеток не затрагивались.

**Пример 4. Исследование антитела к CD94 ATX-130-KIF на приматах, отличных от человека**

[0368] В этом примере описывается поисковое фармакодинамическое исследование (PD) у яванских макак для оценки эффективности ATX-130-KIF *in vivo*.

Материалы и способы

*Поисковое исследование in vivo на приматах, отличных от человека*

[0369] Для исследования были отобраны два здоровых самца яванского макака в возрасте 6,5 и 9,2 года и массой 6,54 и 7,18 кг соответственно, ранее не получавшие все соединения и не имевшие предшествующих заболеваний. Как показано на **фиг. 24А**, две дозы ATX-130-KIF (2 мг/кг) вводили яванскому макаку 1 посредством внутривенной (в/в) инфузии со скоростью приблизительно 0,25 мл/мин. в течение 60 минут на неделе 0 и 8. Две дозы ATX-130-KIF (2 мг/кг) вводили яванскому макаку 2 посредством внутривенной инфузии со скоростью примерно 0,25 мл/мин. в течение 60 минут на неделе 0 и 16. Кровь, сыворотку и РВМС собирали через различные промежутки времени до и после введения дозы, как показано на **фиг. 24А**. PD определяли по истощению клеток-мишеней с помощью анализа проточной цитометрии. Конечная точка исследования была запланирована через 22 недели.

Результаты

[0370] Для оценки эффективности ATX-130-KIF *in vivo* было проведено исследование PD на приматах, отличных от человека (NHP). Для исследования были отобраны два здоровых самца яванского макака в возрасте 6,5 и 9,2 года и массой 6,54 и 7,18 кг (яванский макак 1 и яванский макак 2) соответственно, ранее не получавшие все соединения и не имевшие предшествующих заболеваний. Фармакодинамическую (PD) активность определяли по истощению клеток-мишеней с помощью анализа проточной цитометрии. Все биоаналитические данные были представлены до 18 недель, а конечная точка исследования прогнозировалась на 22 неделе.

[0371] Способность (или ее отсутствие) ATX-130-KIF истощать NK-клетки яванского макака в крови оценивали с помощью анализа проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 24В**, состав NK-клеток в общем количестве РВМС у яванского макака №1 (левая панель) и у яванского макака №2 (правая панель) составлял 20% и 25% на исходном уровне соответственно. Для каждой дозы истощение клеток-мишеней (NK-клеток) до <5% РВМС было обнаружено у обоих животных через 6 часов после введения ATX-130-KIF. У яванского макака 1 наблюдалось устойчивое увеличение процента NK-клеток с 6 часов до 336 часов, которое затем стабилизировалось на уровне 50% от исходного до введения второй дозы через 1008 часов. Стабилизация числа NK-клеток на уровне 50% от исходного уровня наблюдалась через 168 часов после введения второй дозы. У яванского макака 2 восстановление NK-клеток происходило медленнее, чем у яванского макака 1. Количество NK-клеток оставалось на низком уровне через 6 недель после введения дозы 1 с увеличением в течение недель с 8 по 14. Введение ATX-130-KIF

на неделе 16 снижало уровни NK-клеток через 6 часов после введения дозы и оставалось низким вплоть до последнего сбора образцов. В целом текущие результаты показывают, что ATX-130-KIF может демонстрировать эффективность *in vivo* у яванских макаков.

[0372] Способность (или ее отсутствие) ATX-130-KIF истощать CD4 T, CD8 T и В-клетки яванского макака в крови оценивали с помощью анализа проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 25А**, состав CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и В-клеток от общего числа РВМС у яванского макака № 1 составлял 27%, 40% и 4% на исходном уровне соответственно. Как показано на **фиг. 25В**, состав CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и В-клеток от общего числа РВМС у яванского макака № 2 составлял 26%, 40% и 5% на исходном уровне соответственно. Истощение Т- и В-клеток было обнаружено у обоих животных через 6 часов после введения ATX-130-KIF. Однако эти популяции иммунных клеток вернулись к исходному уровню через 24 часа после введения дозы. Результаты этого исследования показывают, что ATX-130-KIF только временно истощает другие иммунные клетки без истощения клеток, не экспрессирующих CD94.

[0373] Истощение моноцитов яванского макака оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 26**, повышение уровня моноцитов наблюдалось через 6 часов после введения дозы, но возвращалось к исходному уровню через 7 дней. Результаты исследования показывают, что ATX-130-KIF временно повышает моноциты, что позволяет предположить, что ATX-130-KIF может задействовать моноциты для выполнения ADCC и способствует целенаправленному истощению NK-клеток.

[0374] Экспрессию CD16 яванского макака на моноцитах оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 27**, повышение CD16 на моноцитах наблюдалось через 24 часа после введения дозы, но возвращалось к исходному уровню через 7 дней. Результаты исследования показывают, что ATX-130-KIF временно повышает CD16 на моноцитах, что позволяет предположить, что ATX-130-KIF задействует моноциты для выполнения ADCC и способствует целенаправленному истощению NK-клеток.

### ***Пример 3. Исследование антитела к CD94 ATX-130 на мышах *in vivo****

[0375] В этом примере описывается характеристика антител, специфичных к CD94 человека, с использованием исследований на мышах *in vivo*.

#### ***Материалы и способы***

##### ***Исследования *in vivo* на гуманизированных IL-15 трансгенных мышах***

[0376] Гуманизированная трансгенная мышь NSG<sup>TM</sup>-IL-15 была получена из лаборатории Jackson. Мышам прививают РВМС здорового донора и донора LGLL на 3 и 28 дни соответственно. Одну дозу человеческого изотипического контроля IgG1 или ATX-130 (5 мг/кг) вводили мышам и оценивали истощение нормальных NK-клеток, нормальных CD8 Т-клеток и CD8 Т-лейкозных клеток в крови, селезенке, костном мозге и печени с помощью проточной цитометрии через 48 часов после введения дозы (**ФИГ. 22А**).

#### **Результаты**

[0377] Способность (или ее отсутствие) АТХ-130 истощать человеческие NK и CD8 Т-клетки оценивали на трансгенных IL-15 мышах (NSG<sup>TM</sup>-IL-15). Гуманизированная трансгенная мышь NSG<sup>TM</sup>-IL-15 представляет собой линию мышей с полным отсутствием гамма-гена мышиного IL-2R, что приводит к дефектам адаптивной и врожденной иммунной системы. Экспрессия человеческого IL-15 обеспечивает эффективное приживание иммунных клеток человека, особенно цитотоксических иммунных клеток, от здоровых доноров и пациентов с лейкозом. Как показано на **фиг. 22В**, полное истощение NK-клеток наблюдалось при лечении АТХ-130 (5 мг/кг) по сравнению с изотипическим контролем. Наблюдалось частичное истощение (~50%) CD8 Т-клеток. Остальные CD8 Т-клетки были CD94-отрицательными и, таким образом, не были истощены. В целом, АТХ-130 истощает клетки CD94+, включая все NK-клетки человека и 50% CD8 Т-клеток.

[0378] Способность (или ее отсутствие) АТХ-130-KIF истощать LGLL в крови, селезенке, костном мозге и печени оценивали на трансгенных IL-15 мышах (NSG<sup>TM</sup>-IL-15). Как показано на **фиг. 23**, при лечении АТХ-130 (5 мг/кг) наблюдалось истощение клеток LGLL более чем на 50% по сравнению с изотипическим контролем. Остальные клетки LGLL были CD94-отрицательными и, таким образом, не были истощены. В целом, АТХ-130 эффективно истощает клетки CD94+ LGLL у мышей *in vivo*.

***Пример 5. Не соответствующее требованиям GLP исследование антитела к CD94 АТХ-130 на приматах, отличных от человека***

[0379] В этом примере описывается второе фармакодинамическое исследование (PD) у яванских макаков для оценки эффективности АТХ-130 *in vivo*.

*Материалы и способы*

*Не соответствующее требованиям GLP исследование *in vivo* на приматах, отличных от человека*

[0380] Для исследования было выбрано второе фармакодинамическое (PD) исследование 14 здоровых яванских макаков, ранее не принимавших все соединения и не имевших предшествующих заболеваний. Пять доз АТХ-130 (0-100 мг/кг) вводили посредством внутривенной (в/в инфузии со скоростью около 0,25 мл/мин. в течение 60 минут еженедельно. РВМС собирали через различные промежутки времени до и после введения дозы. PD определяли по истощению NK-клеток (CD3-CD16+) и истощению CD8 Т-клеток (CD3+CD8+NKG2A+) в крови с помощью анализа проточной цитометрии. Истощение одних и тех же клеток-мишеней определяли в тканях, которые были собраны во время вскрытия.

*Результаты*

[0381] Для оценки эффективности АТХ-130 *in vivo* было проведено второе фармакодинамическое (PD) исследование на ННР (яванских макаках; **фиг. 28А**). Чтобы продемонстрировать активность АТХ-130 *in vivo* в ННР, АТХ-130 использовали в качестве тестового образца. Для исследования были отобраны четырнадцать здоровых яванских макаков, не получавших все соединения до начала исследования и не болевших

ранее.

[0382] Способность (или ее отсутствие) АТХ-130 истощать НК-клетки яванского макака в крови оценивали с помощью анализа проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 28В**, истощение клеток-мишеней (НК-клеток) до <5% РВМС было обнаружено у всех животных через 6 часов после введения АТХ-130 в каждой дозе. В целом текущие результаты показывают, что АТХ-130 может демонстрировать эффективность *in vivo* у яванских макаков в дозах 5, 50 и 100 мг/кг.

[0383] Способность (или ее отсутствие) АТХ-130 истощать CD94+CD8+NKG2A+ клетки яванского макака в крови при дозах 5, 50 и 100 мг/кг оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **фиг. 29**, истощение клеток-мишеней (Т-клеток CD8) до <50% РВМС было обнаружено у всех животных через 8 дней после введения АТХ-130 в каждой дозе. В целом текущие результаты показали, что АТХ-130 может демонстрировать эффективность *in vivo* на CD94+ CD8 Т-клетках у яванских макаков в дозах 5, 50 и 100 мг/кг.

[0384] Способность (или ее отсутствие) АТХ-130 истощать НК- и CD8+NKG2A+ Т-клетки яванского макака в ткани оценивали по потоку. Как показано на **фиг. 30**, в конце исследования было обнаружено истощение клеток-мишеней (НК- и CD8 Т-клеток) до <50% от общего количества клеток у животных, получавших 5, 50 и 100 мг/кг АТХ-130 по сравнению с 0 мг/кг. В целом текущие результаты показали, что АТХ-130 может демонстрировать эффективность *in vivo* в отношении НК- и CD94+ CD8 Т-клеток в ткани яванского макака.

#### ***Пример 6. Характеристика дополнительных антител к CD94***

[0385] В этом примере описывается характеристика дополнительных антител к CD94 АТХ в отношении связывания клеток, экспрессирующих CD94, и блокирование лиганда CD94.

[0386] Сначала исследовали аффинность связывания клеток антител к CD94 АТХ-122, -123, -124, -125, -126, -127, -128, -129 и -130. Для связывания человеческих НК-клеток РВМС были свежeweделены от здоровых доноров и инкубированы с неконъюгированными антителами в серии разведений от 100 нМ до 0,046 нМ. Вторичное антитело человека, меченное Alexa Fluor 647, использовали для обнаружения связывания с яркими CD3-CD56 НК-клетками. Для связывания CD94 яванского макака клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие CD94 яванского макака, инкубировали с неконъюгированными антителами в серии разведений от 100 нМ до 0,046 нМ. Вторичное антитело человека, меченное Alexa Fluor 647, использовали для обнаружения связывания на клетках

[0387] Результаты показали, что антитела к CD94 серии АТХ связывали НК-клетки человека (**фиг. 31А**) и клетки, сверхэкспрессирующие CD94 яванского макака (имитирующие НК-клетки яванского макака; **фиг. 31В**). В свежeweделенных РВМС от здоровых доноров и клетках НЕК293, экспрессирующих CD94 яванского макака, антитела АТХ к CD94 связывались с аффинностью (EC50) в диапазоне от 0,3 до 27 нМ.

[0388] Во-вторых, антитела к CD94 ATX-122, -123, -124, -125, -126, -127, -128, -129 и -130 были охарактеризованы в анализах блокирования тетрамера HLA-E, чтобы определить, блокируют ли они связывание HLA-E. PBMC здоровых доноров инкубировали с антителами к CD94. Затем тетрамер HLA-E, меченный PE, инкубировали со смесью клеток и антител и определяли с помощью проточной цитометрии.

[0389] Результаты показали, что большинство антител к CD94 не блокировали связывание HLA-E (фиг. 32А-32I). Процент блокировки рассчитывали как  $100 - ((\text{процент положительных результатов HLA-E для антитела к CD94}) / (\text{процент положительных результатов HLA-E для изотипа})) * 100$ . Если антитело блокировало более 20% связывания HLA-E, оно считалось антителом, блокирующим лиганд. В целом, 6 из 9 антител к CD94 серии ATX не блокировали связывание HLA-E, тогда как коммерчески доступные антитела к CD94 блокировали это взаимодействие (см. пример 1). Сводная информация о характеристиках антител к CD94 серии ATX представлена в таблице 3.

**Таблица 3.** Сводная информация о характеристиках антител к CD94 серии ATX

<b>Антитело</b>	<b>Аффинность к NK-клеткам человека (нМ)</b>	<b>Перекрестная реактивность CD94 яванского макака</b>	<b>Блокирование HLA-E</b>
ATX-122	27,04	Нет	0%
ATX-123	1,12	Да	39%
ATX-124	10,03	Нет	18%
ATX-125	4,63	Да	11%
ATX-126	2,52	Да	0%
ATX-127	0,31	Да	77%
ATX-128	0,32	Нет	10%
ATX-129	2,8	Да	96%
ATX-130	0,6	Да	0%

[0390] Хотя настоящее раскрытие было описано довольно подробно посредством иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, описания и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего раскрытия. Описание всей патентной и научной литературы, цитируемой в данном документе, включено в полном объеме посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Человеческое или гуманизированное антитело, которое связывается с CD94 человека, где связывание антитела с CD94 человека не блокирует связывание между CD94 человека и HLA-E человека.
2. Антитело по п. 1, при этом антитело связывается с CD94 человека, экспрессированным на поверхности клетки.
3. Антитело по п. 2, при этом клетка является естественной клеткой-киллером (NK) человека.
4. Человеческое или гуманизированное антитело, которое связывается с CD94 человека и CD94 яванского макака.
5. Антитело по п. 4, при этом антитело связывается с CD94 человека, экспрессированном на поверхности клетки.
6. Антитело по п. 5, при этом клетка является естественной клеткой-киллером (NK) человека.
7. Антитело по любому из пп. 4-6, при этом связывание антитела с CD94 человека не блокирует связывание между CD94 человека и HLA-E человека.
8. Антитело по любому из пп. 1-3 и 7, при этом связывание антитела с клетками, экспрессирующими CD94 человека, блокирует менее 20% связывания HLA-E с CD94 человека.
9. Антитело по любому из пп. 1-8, при этом инкубация антитела с клеткой, экспрессирующей CD94 человека на ее поверхности, в течение 24 часов при 37°C приводит к снижению окрашивания поверхности антитела менее чем на 50% вследствие интернализации.
10. Антитело по любому из пп. 1-9, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6.
11. Антитело по любому из пп. 1-9, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH











идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61.

24. Антитело по любому из пп. 1-9, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом:

(a) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

(b) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

(c) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46;

(d) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52;

(e) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, CDR-H2, содержащую аминокислотную



аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52;

(e) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; или

(f) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:109, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:110, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

26. Антитело по любому из пп. 4-6, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом:

(a) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

(b) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(c) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

27. Антитело по любому из пп. 4-6, при этом антитело содержит переменный

домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом:

(a) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

(b) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(c) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:108, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61.

28. Антитело по любому из пп. 1-9, 22, 24, и 25, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом:

(a) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:65, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66;

(b) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:69, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:70;

(c) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:71, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72;



NO:76; или

(с) домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:80.

31. Антитело по п. 30, при этом:

(а) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68;

(б) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76; или

(с) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80.

32. Антитело, которое связывается с CD94 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6.

33. Антитело по п. 32, при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

34. Антитело по п. 32 или п. 33, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью

последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20.

35. Антитело по п. 34, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

36. Антитело, которое связывается с CD94 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

37. Антитело по п. 36, при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

38. Антитело по п. 36 или п. 37, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22.

39. Антитело по п. 38, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

40. Антитело, которое связывается с CD94 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную

последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

41. Антитело по п. 40, при этом домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

42. Антитело по п. 40 или п. 41, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24.

43. Антитело по п. 42, при этом домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

44. Антитело, которое связывается с CD94 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом:

(a) домен VH содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:30, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:31, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32; и при этом домен VL содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью























человеческое антитело.

51. Антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело по любому из пп. 10-50.

52. Антитело, которое конкурирует с антителом по любому из пп. 10-51 за связывание с CD94 человека.

53. Антитело по любому из пп. 1-52, при этом антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.

54. Антитело по любому из пп. 1-52, при этом антитело дополнительно содержит Fc-область.

55. Антитело по п. 54, при этом Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека.

56. Антитело по п. 54 или п. 55, при этом антитело содержит нефукозилированную Fc-область человека.

57. Антитело по любому из пп. 54-56, при этом антитело связывается с человеческим клеточным Fc-гамма-рецептором IIIA в большей степени, чем антитело, содержащее Fc-область IgG1 человека дикого типа.

58. Антитело по любому из пп. 54-57, при этом антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клетки, экспрессирующей CD94 человека на своей поверхности.

59. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-58.

60. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 59.

61. Вектор по п. 60, при этом вектор является вектором экспрессии.

62. Выделенная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 59 или вектор по п. 60 или п. 61.

63. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 62 в условиях, подходящих для получения антитела.

64. Способ по п. 63, дополнительно включающий выделение антитела из клетки-хозяина.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-58 и фармацевтически приемлемый носитель.

66. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65.

67. Способ по п. 66, при этом введение антитела приводит к снижению количества LGL или NK-клеток периферической крови у субъекта.

68. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой синдром Фелти, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов синдрома Фелти у субъекта.

69. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой миозит с тельцами-включениями, и при этом введение антитела субъекту приводит к

уменьшению одного или нескольких симптомов миозита с тельцами-включениями у субъекта.

70. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой агрессивный NK-лейкоз, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или более симптомов агрессивного NK-лейкоза у субъекта.

71. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов ревматоидного артрита у субъекта.

72. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой лейкоз LGL, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лейкоза LGL у субъекта.

73. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой CLPD-NK, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или более симптомов CLPD-NK у субъекта.

74. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой лимфому из клеток естественных киллеров (NK) или Т-клеток, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов лимфомы у субъекта.

75. Способ по п. 66, при этом заболевание или нарушение представляет собой микроскопический колит, и при этом введение антитела субъекту приводит к уменьшению одного или нескольких симптомов микроскопического колита у субъекта.

76. Способ уменьшения количества LGL и/или NK-клеток периферической крови у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65.

77. Способ индуцирования активности ADCC у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65.

78. Способ лечения CLPD-NK у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65.

79. Способ по п. 78, при этом введение антитела приводит к улучшению одного или нескольких симптомов CLPD-NK у субъекта.

80. Способ лечения лимфомы естественных клеток-киллеров (NK) или Т-клеточной лимфомы, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, которое связывает с CD94 человека.

81. Способ по п. 80, при этом антитело не связывается с тем же эпитопом на CD94 человека, что и клоны антител к CD94 HP-3D9, DX22, 131412 или 12K45.

82. Способ по п. 80, при этом антитело связывается с CD94 человека с большей аффинностью, чем клоны антител к CD94 HP-3D9, DX22, 131412 и 12K45.

83. Способ по любому из пп. 74 и 80-82, при этом NK-клеточная или Т-клеточная

лимфома представляет собой экстранодальную НК-/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную Т-клеточную лимфому (TCL), TCL, ассоциированную с энтеропатией, кожную TCL, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK+), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALK-), периферическую TCL, ангиоиммунобластную TCL, TCL взрослых, мономорфную эпителиотропную кишечную TCL, эпидермотропную CD8+ кожную TCL, первичную кожную гамма/дельта TCL или подкожную панникулитную TCL.

84. Способ по п. 83, при этом НК-клеточная или Т-клеточная лимфома представляет собой экстранодальную НК/Т-клеточную лимфому, печеночно-селезеночную TCL или TCL, ассоциированную с энтеропатией.

85. Способ усиления терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) у человека, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65 до введения субъекту терапии CAR-T.

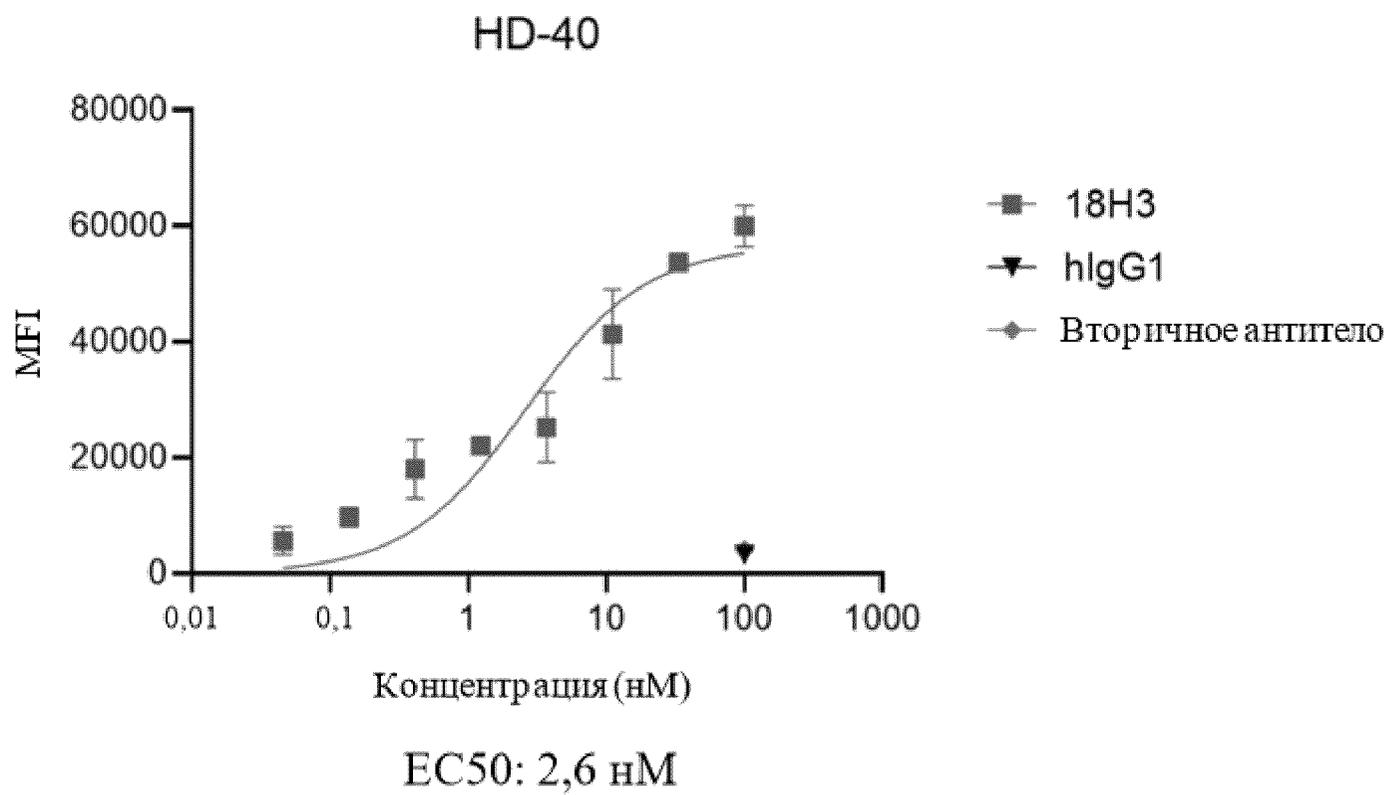
86. Способ по п. 85, при этом введение антитела или композиции приводит к истощению НК-клеток у субъекта перед получением лечения с помощью CAR-T.

87. Способ истощения CD8+ CD94+ Т-клеток у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-58 или композиции по п. 65.

88. Способ по любому из пп. 66-87, дополнительно включающий введение субъекту полипептида IL-2.

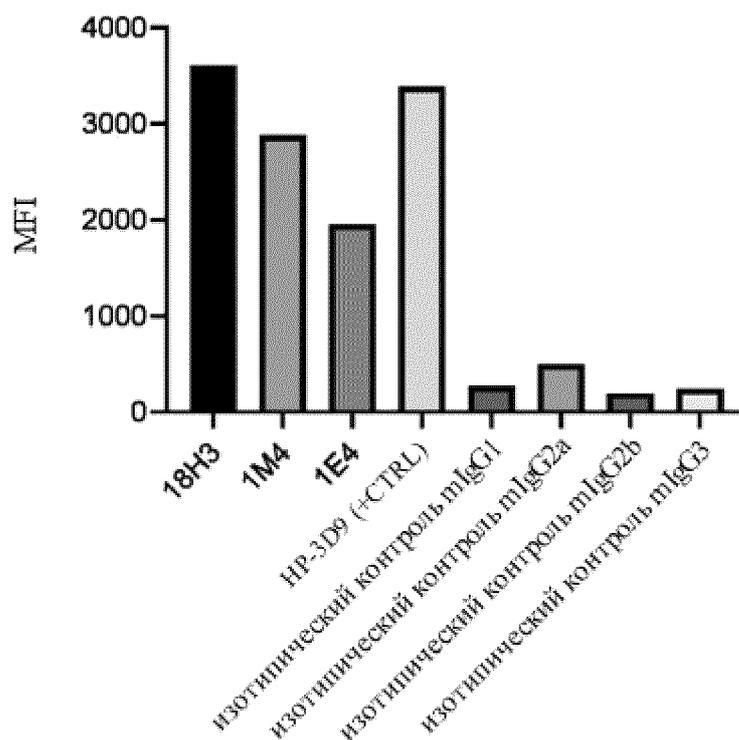
89. Способ по любому из пп. 66-88, при этом субъект представляет собой человека.

По доверенности



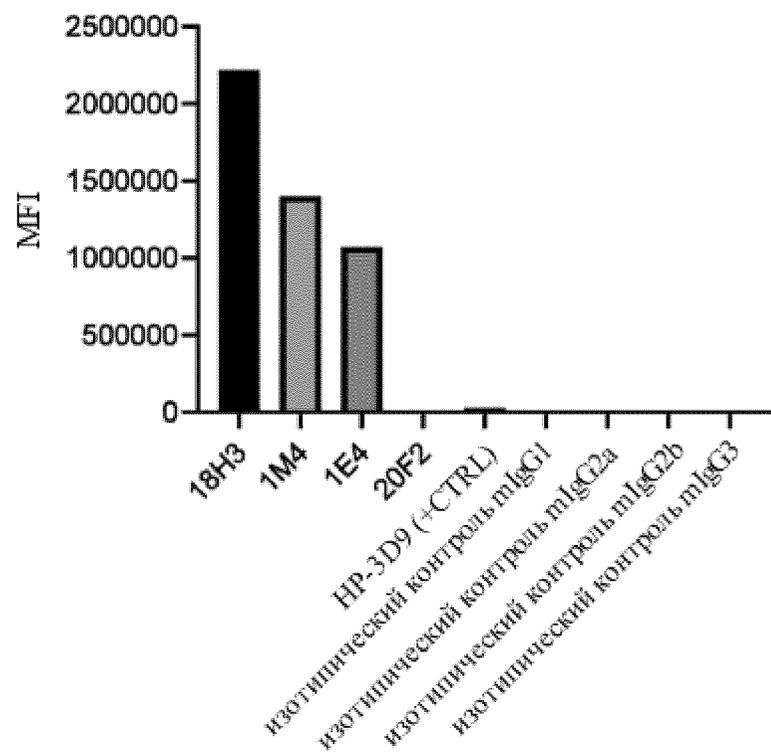
Фиг. 1

Гибридные антитела,  
связывающиеся с первичными НК-  
клетками человека



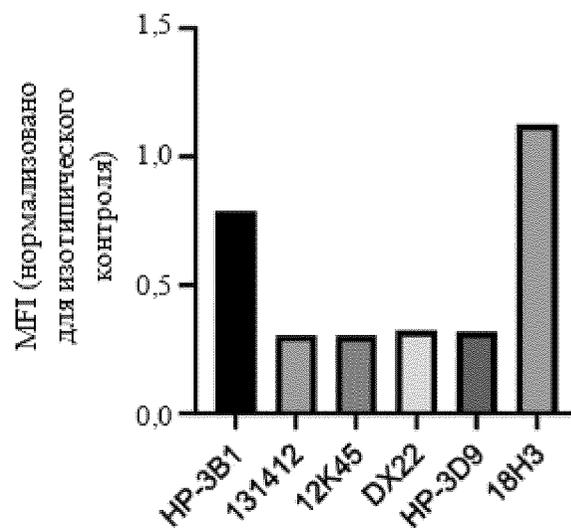
Фиг. 2

**Перекрестная реактивность гибридных антител с CD94 яванского макака**



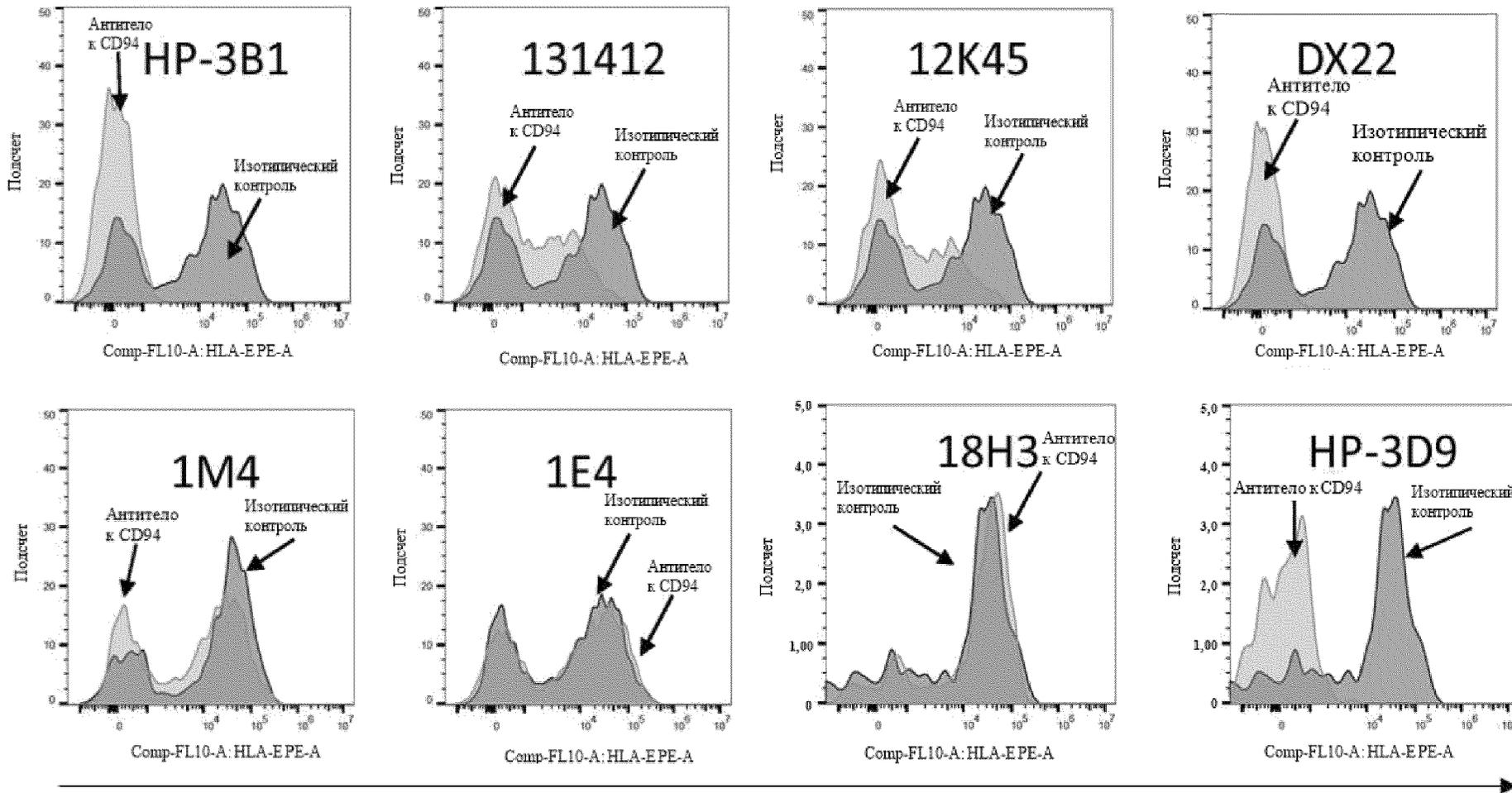
**Фиг. 3А**

**Коммерческое антитело к CD94, связывающееся с CD94 яванского макака**



**Фиг. 3В**

Подсчет

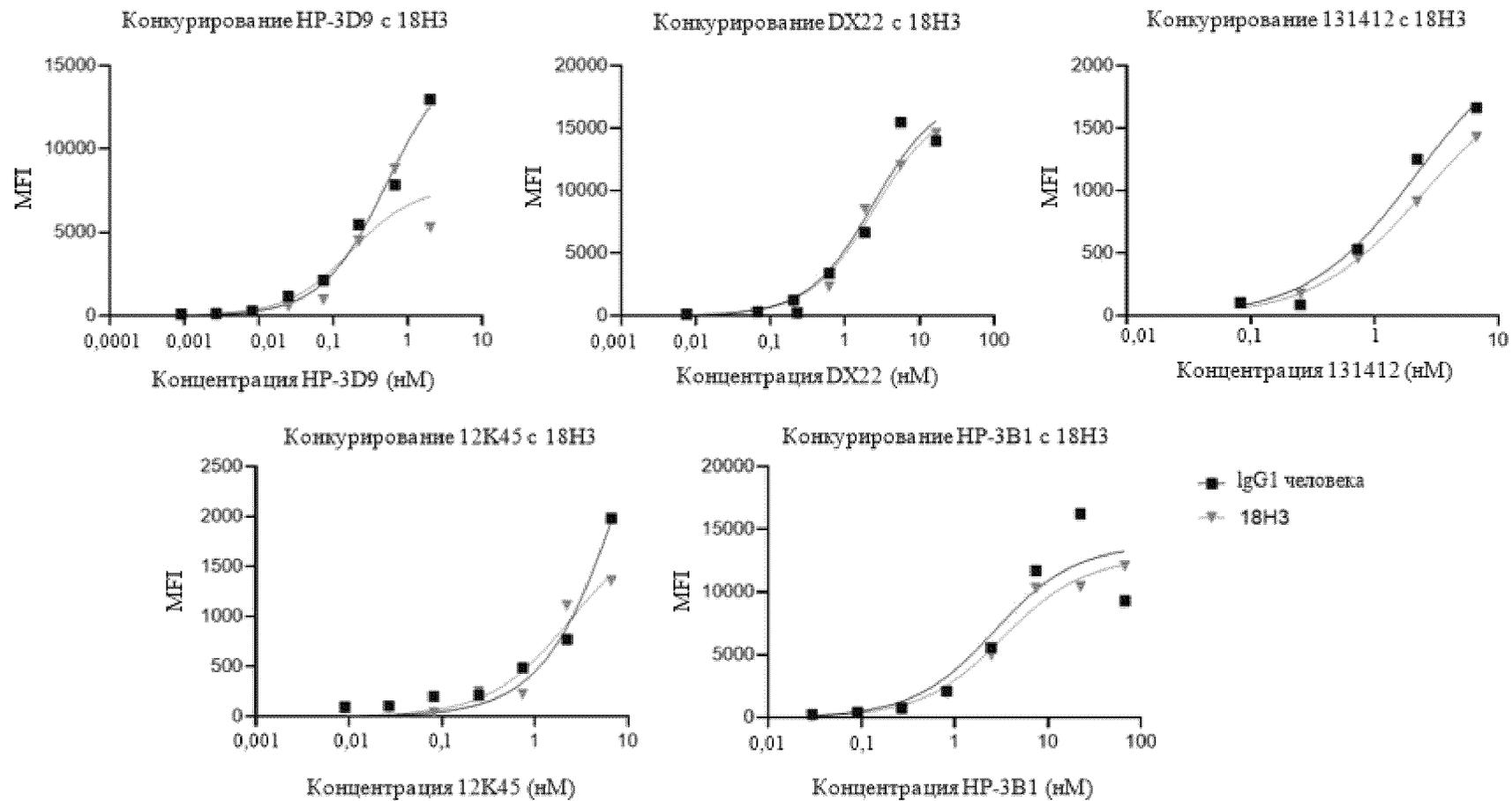


4/49

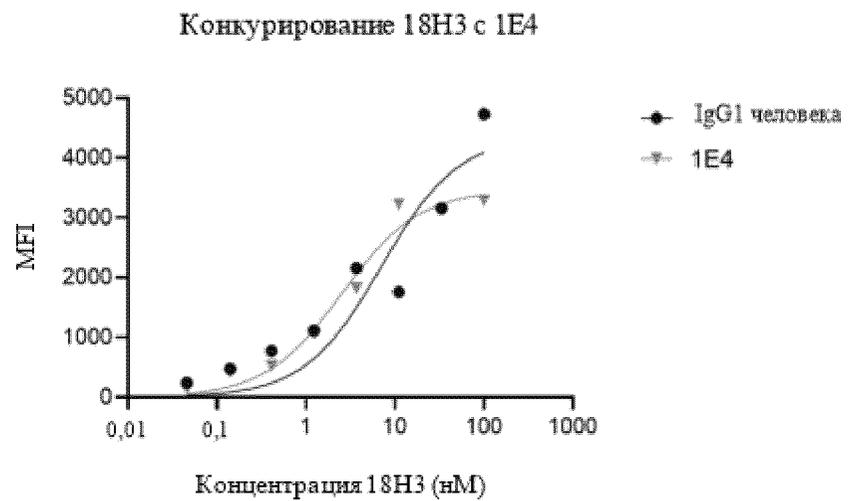
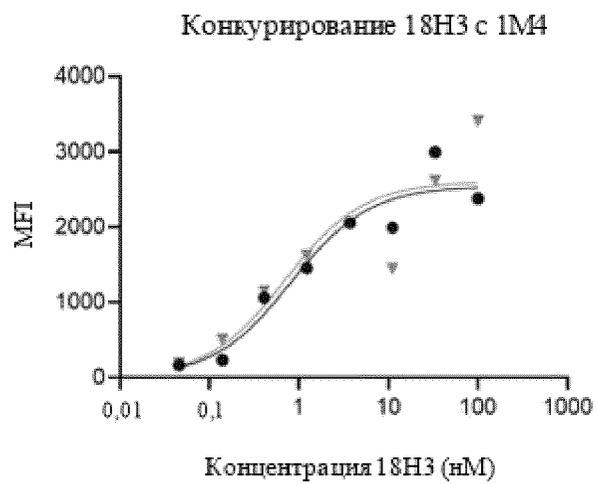
Изотипический контроль  
Антитело к CD94

HLA-E PE

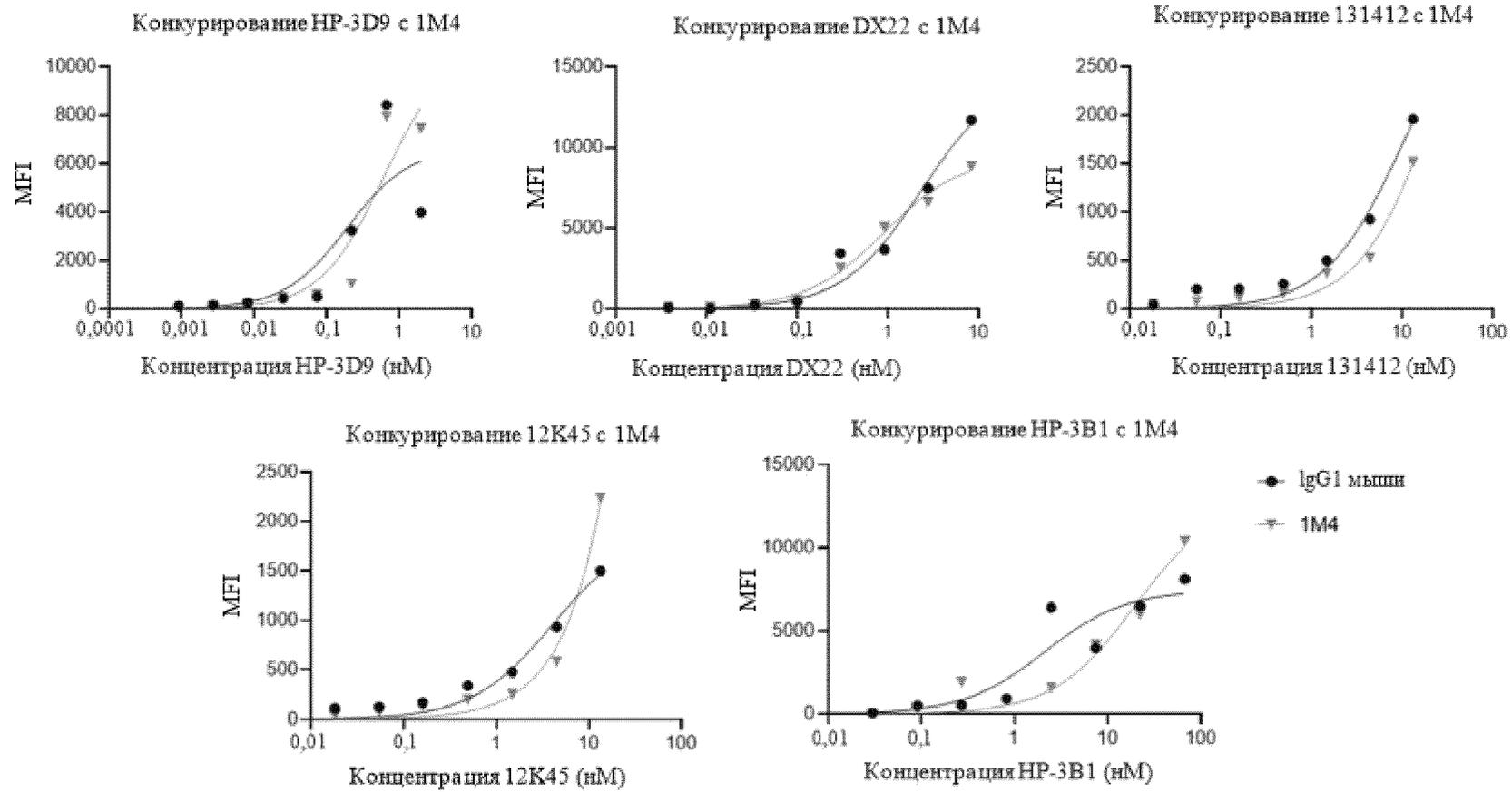
Фиг. 4



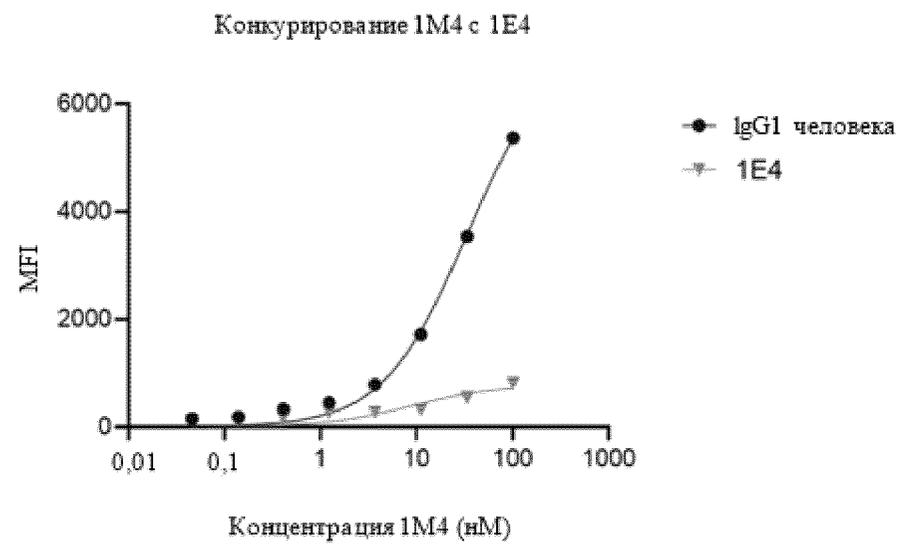
Фиг. 5А



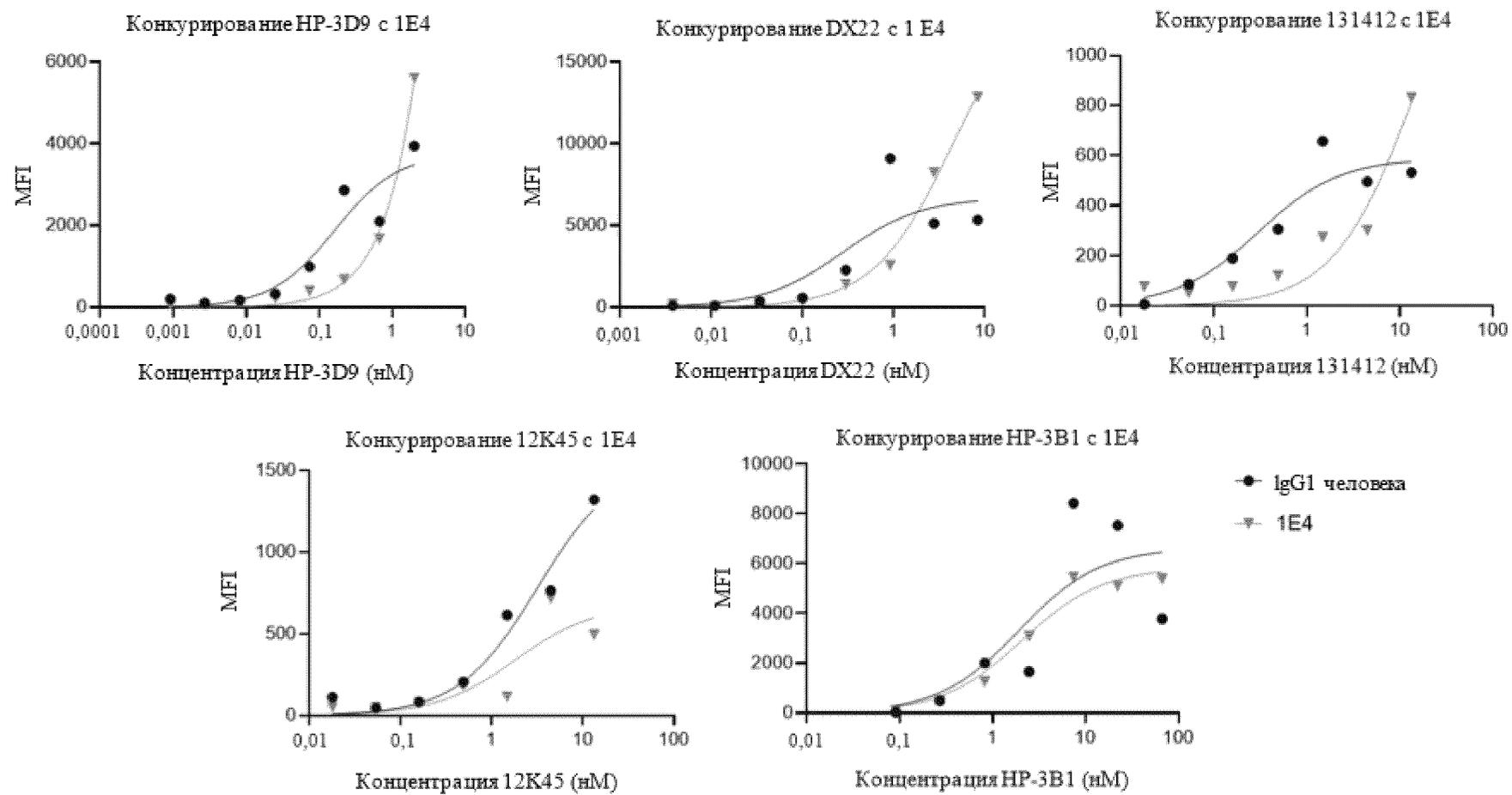
Фиг. 5В



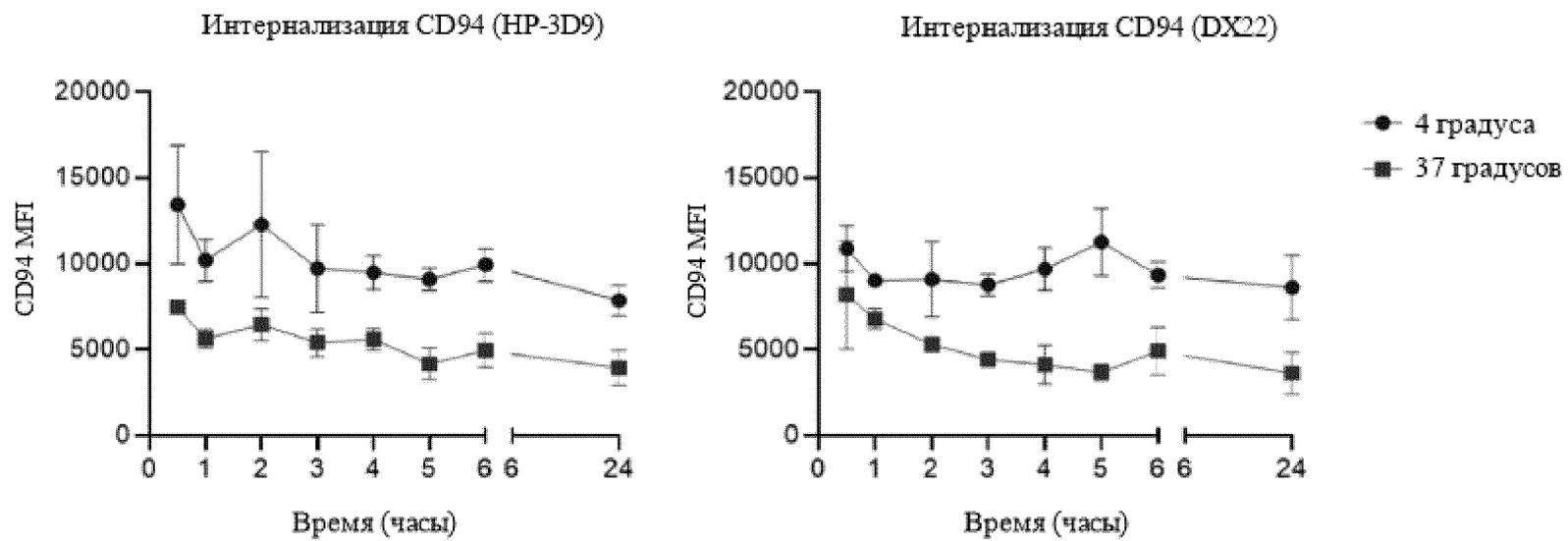
Фиг. 6А



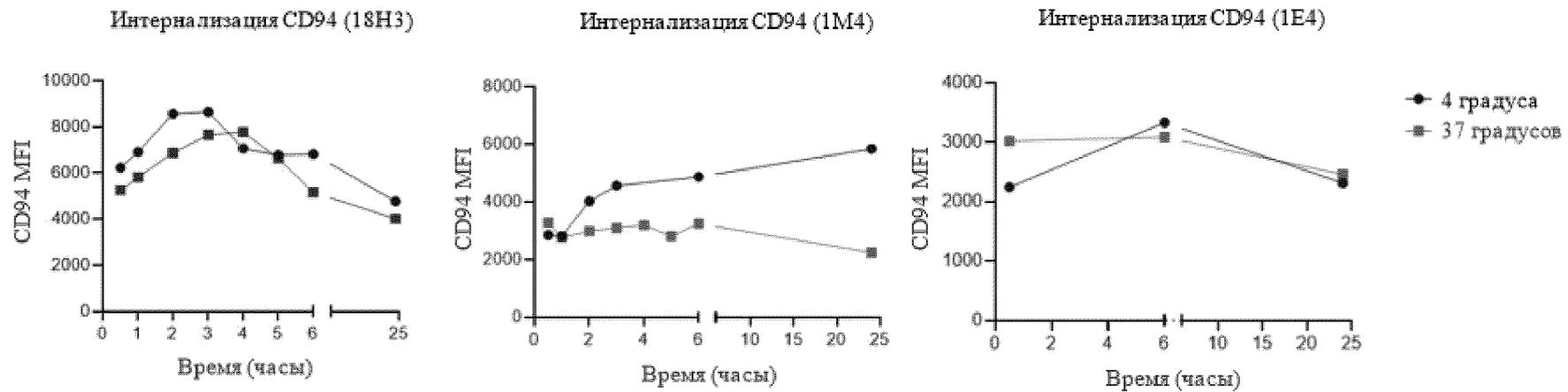
Фиг. 6В



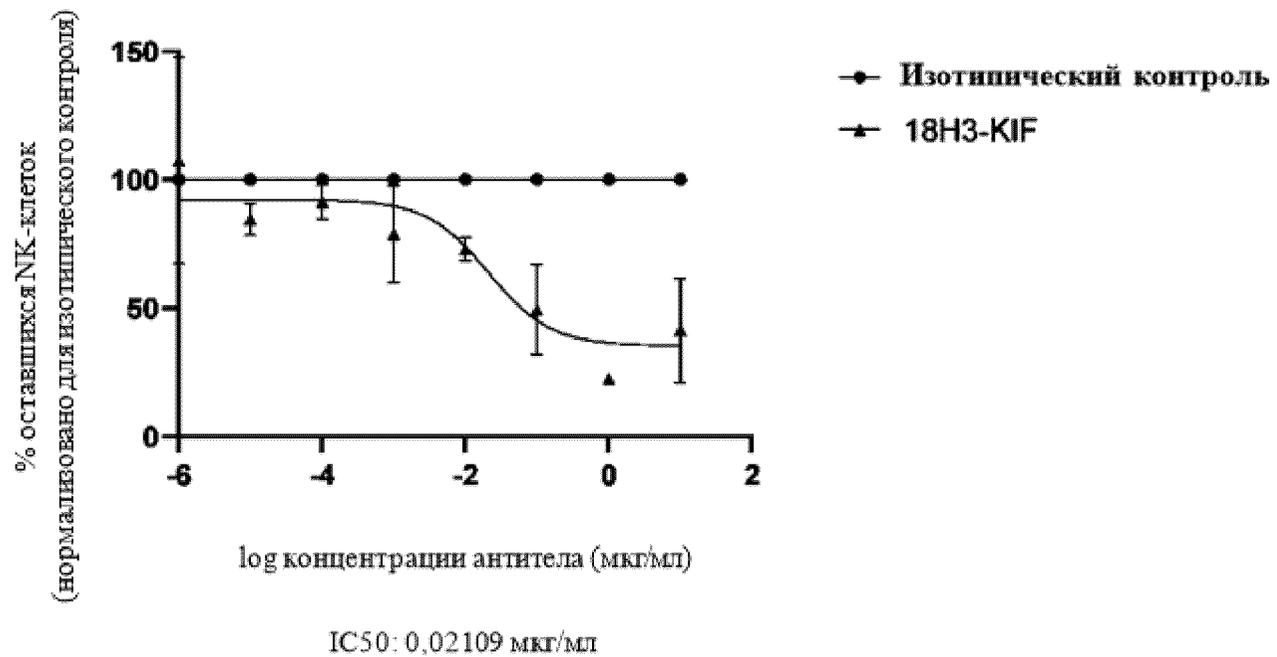
Фиг. 7



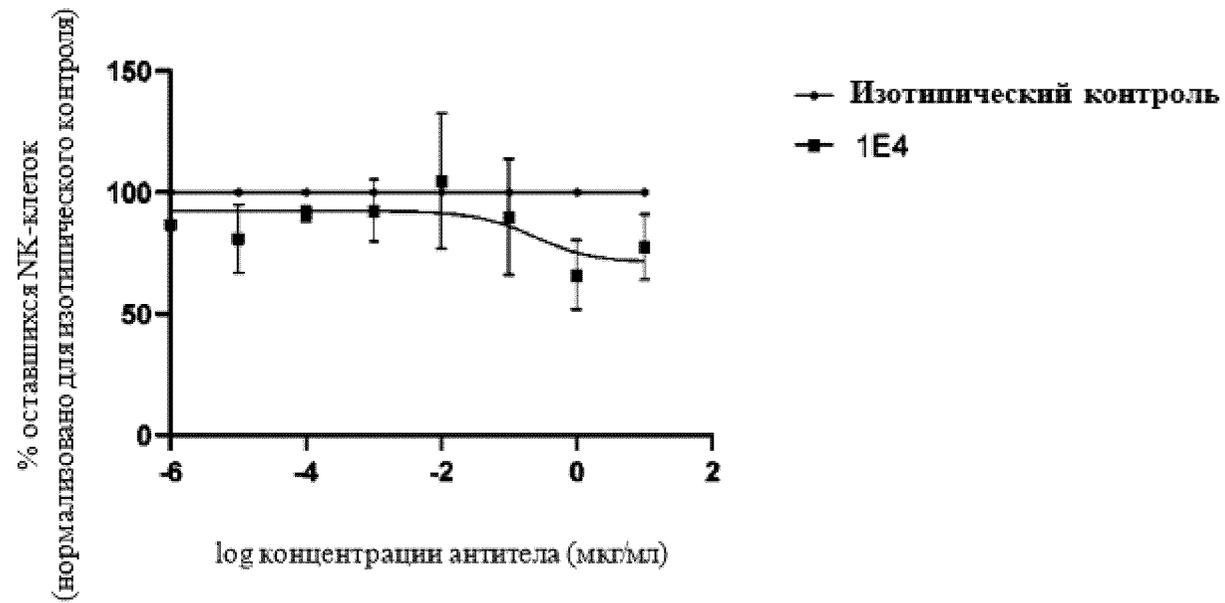
Фиг. 8А



Фиг. 8В

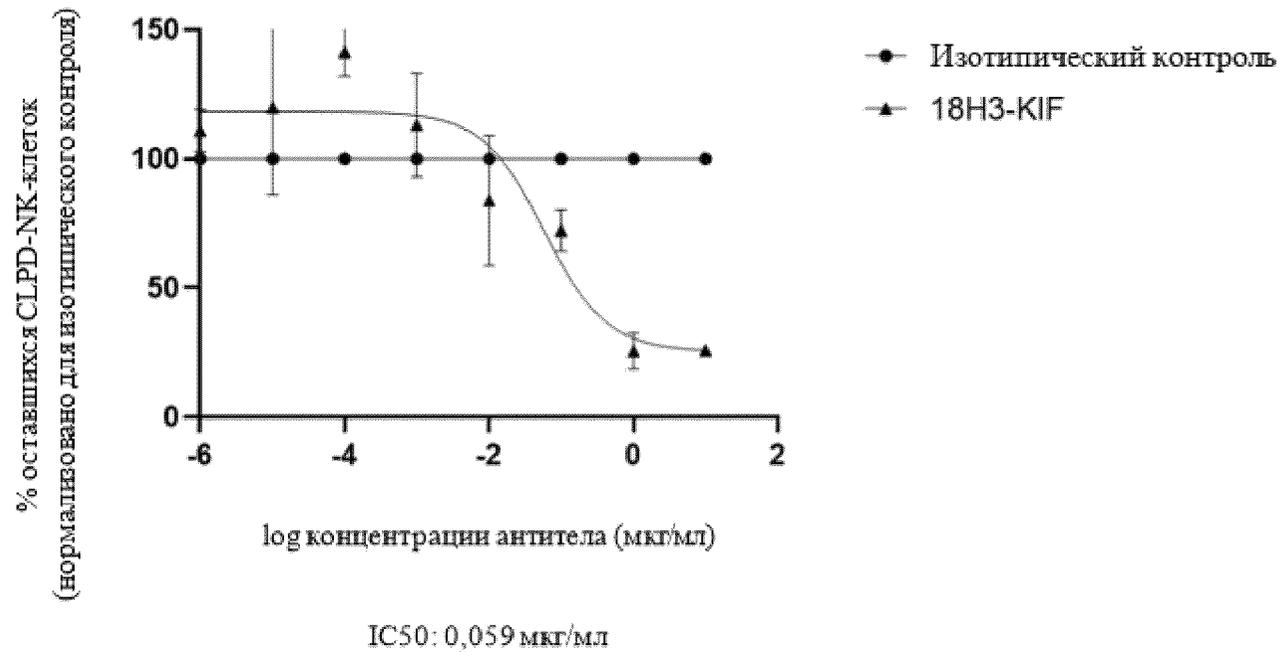


Фиг. 9А



IC50: ND

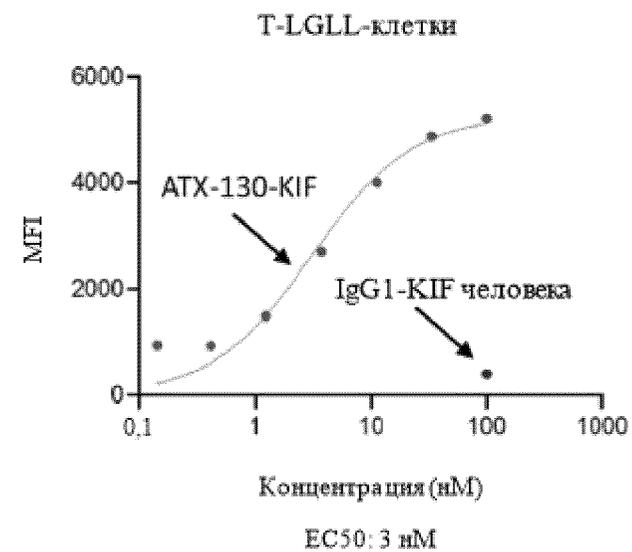
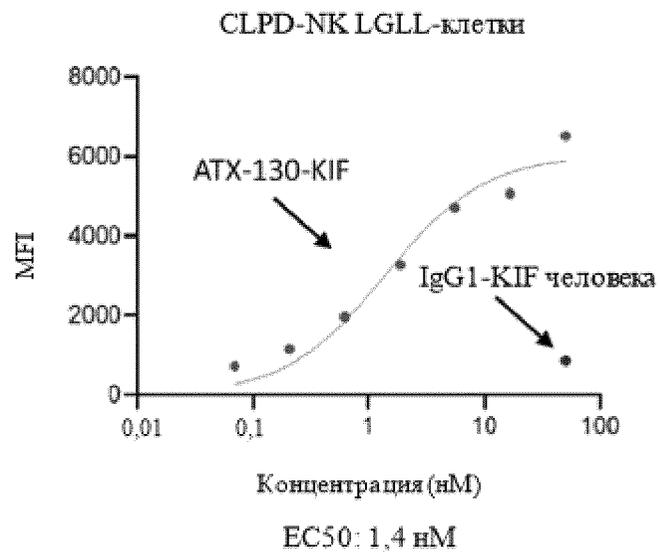
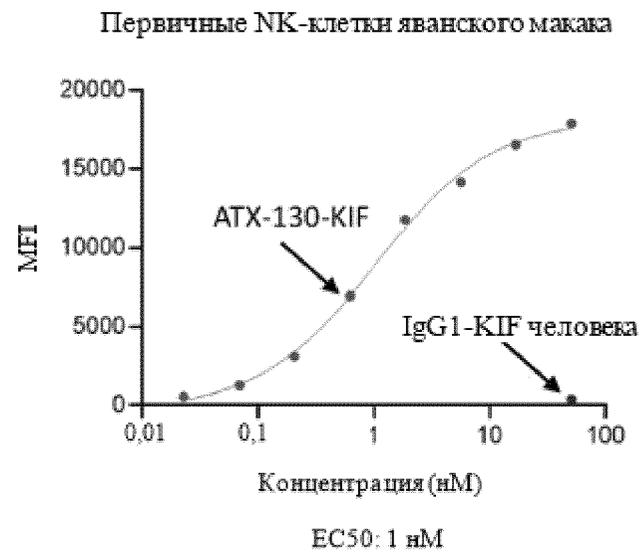
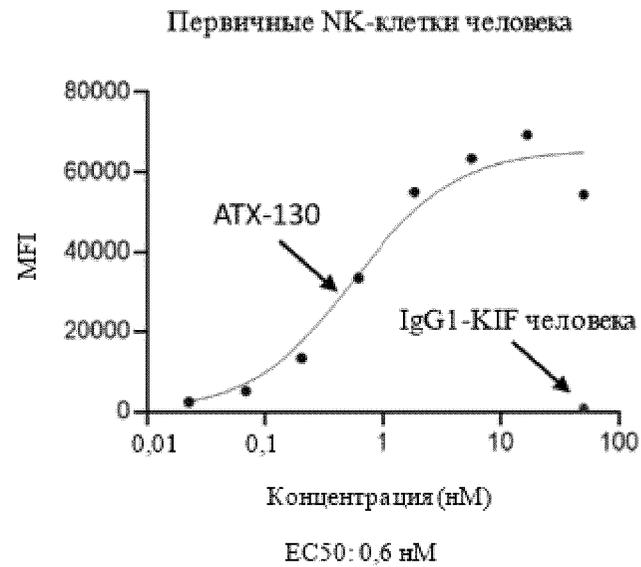
Фиг. 9В



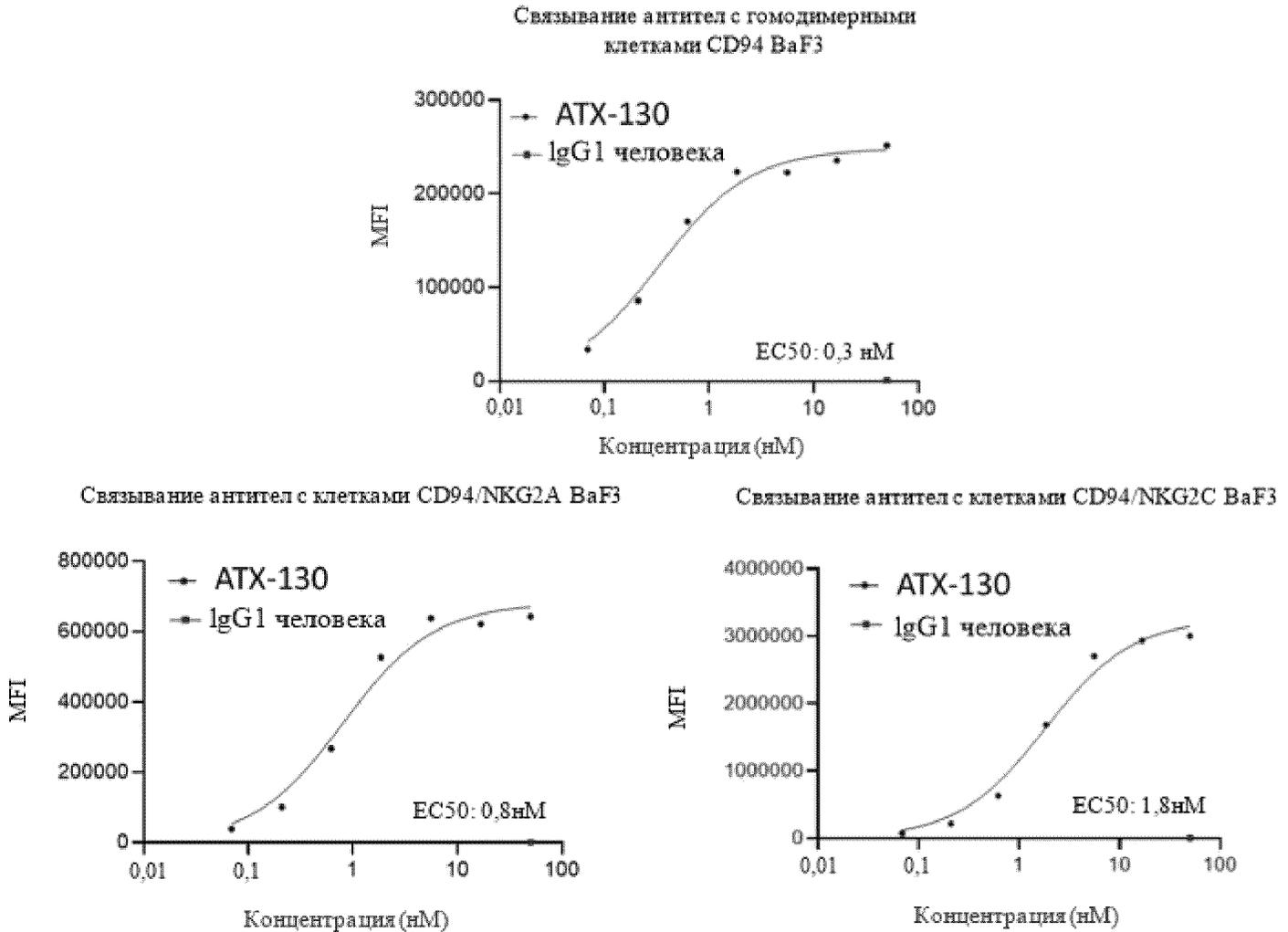
Фиг. 10

Антитело	Аффинность с NK-клеткам человека	Перекрестная реактивность CD94 льянского макака	Блокирование HLA-E	Конкурирование антитела	Интернализация антител от 0,5 до 24 часов при 37°C	Активность ADCC в здоровых NK-клетках	Активность ADCC в здоровых нецелевых клетках	Активность ADCC в LGLL	Активность ADCC в нецелевых клетках LGLL
HP-3D9	0,07 нМ	Нет	99%	Частично с 18H3	53%	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
DX22	0,15 нМ	Нет	99%	Отсутствует	56%	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
HP-3B1	3 нМ	Нет	99,8%	Отсутствует	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
131412	11 нМ	Нет	40%	Отсутствует	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
12K45	7 нМ	Нет	47%	Частично с 1E4	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
18H3	2,6 нМ	Да	0%	Частично с HP-3D9	24%	IC50: 0,02 мкг/мл	Отсутствует	IC50: 0,059 мкг/мл	Отсутствует
1M4	7 нМ	Да	0%	1E4	32%	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
1E4	75 нМ	Да	0%	1M4; Частично с 12K45	18%	Наблюдается истощение; IC50 ND	Отсутствует	Н/П	Отсутствует

Фиг. 11

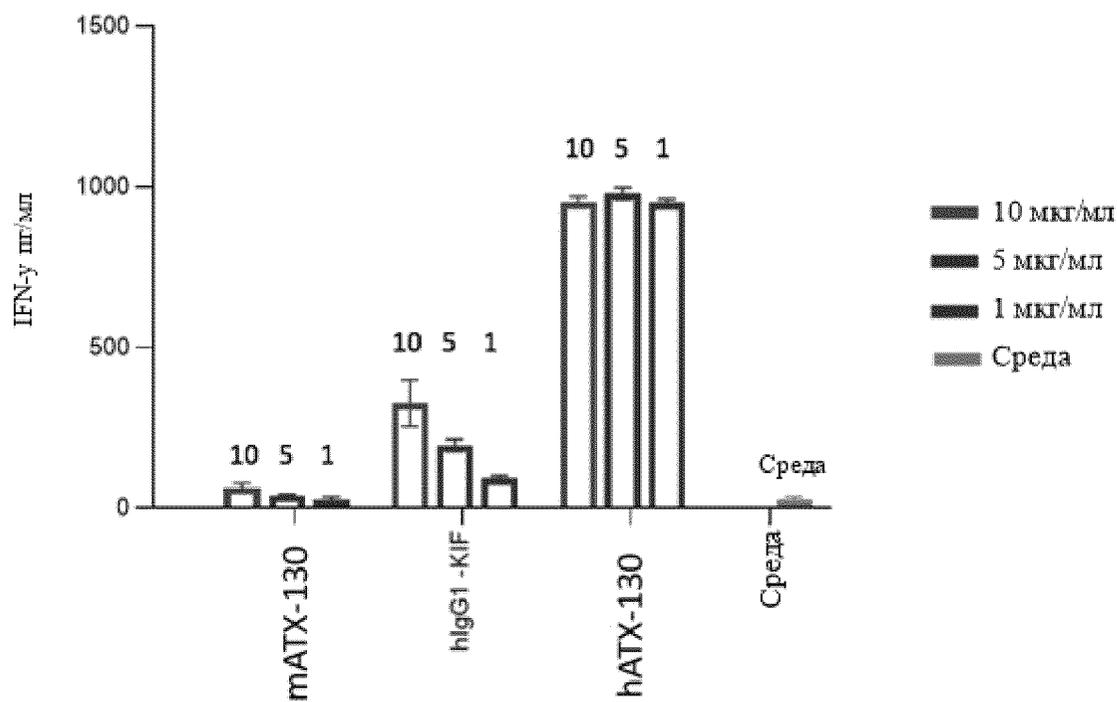


Фиг. 12

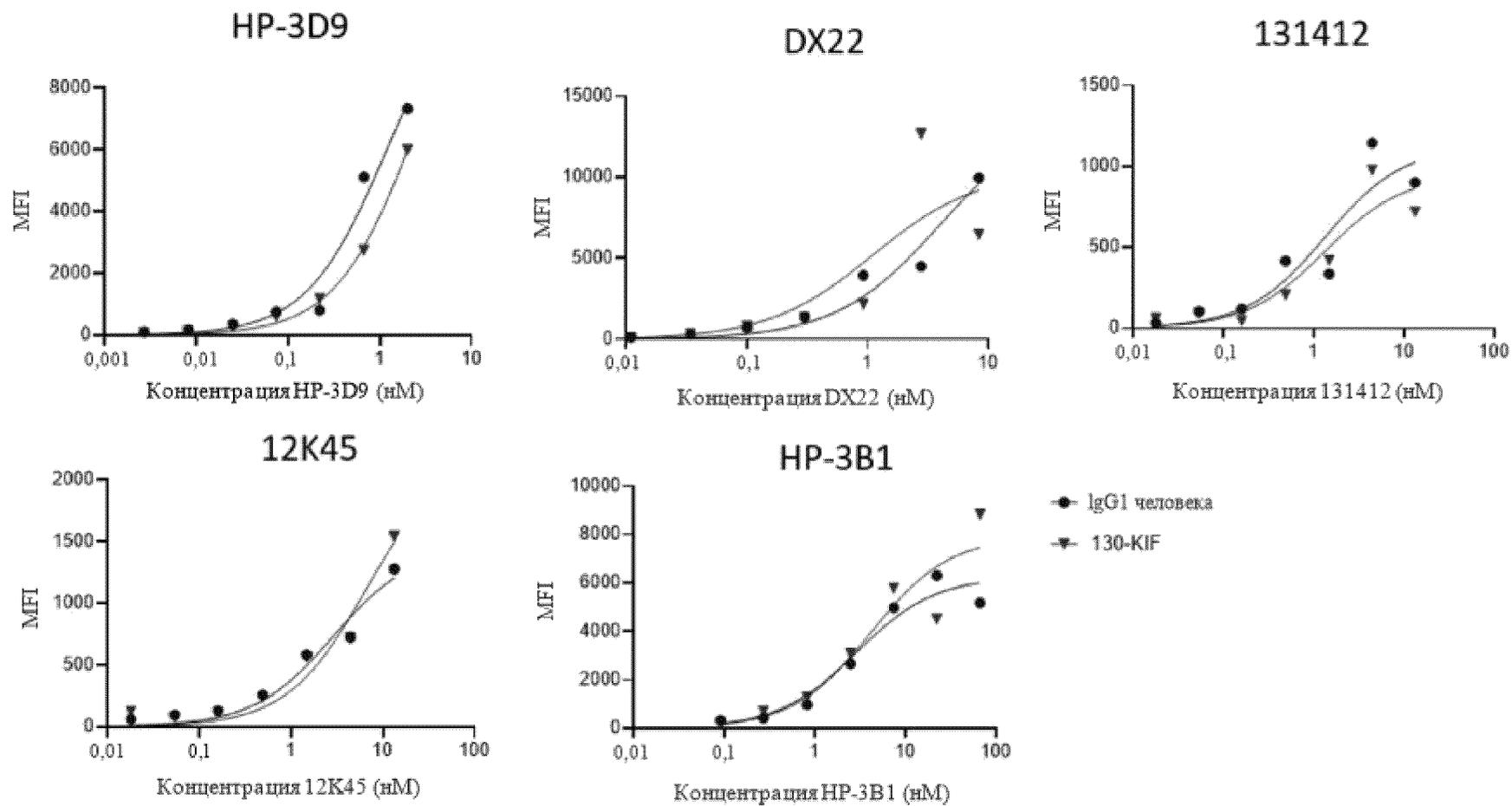


**Фиг. 13**

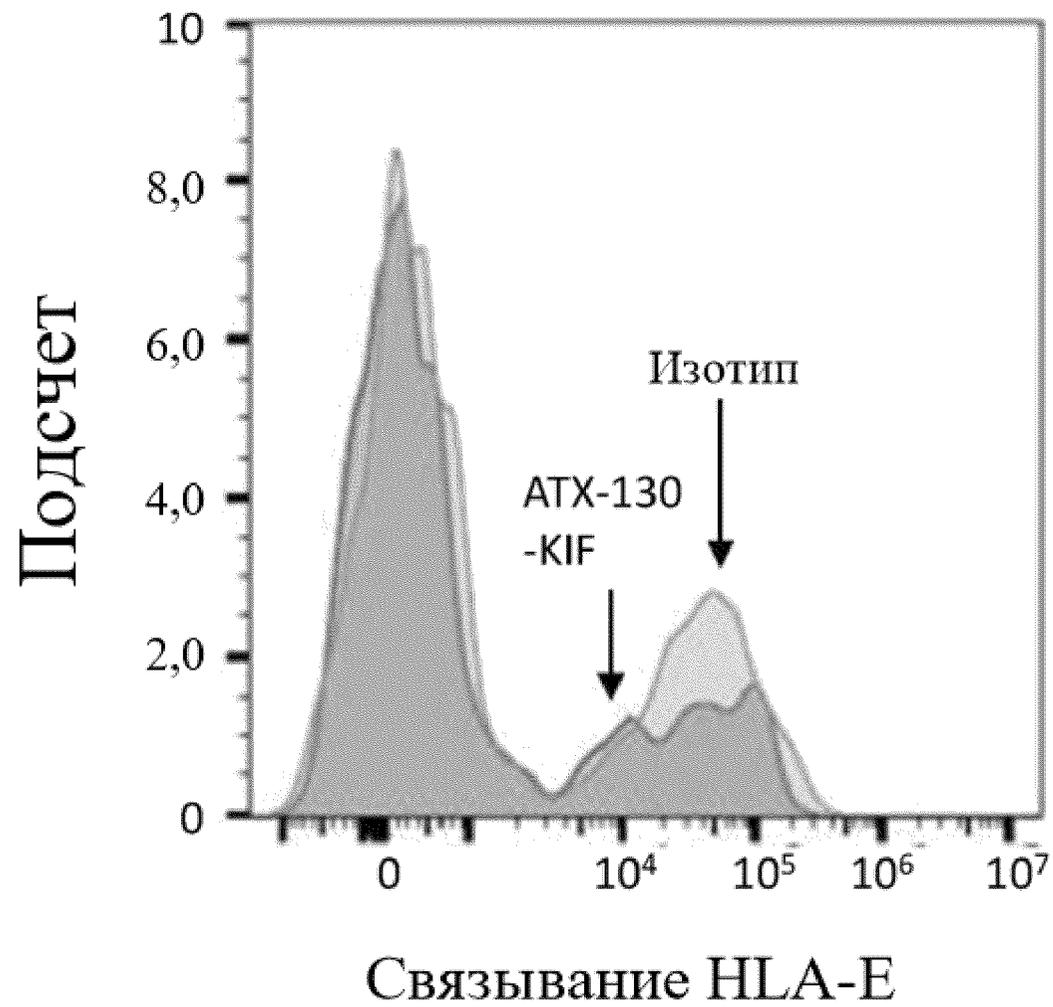
Секреция IFN- $\gamma$  НК-клетками, обработанными АТХ-130, в течение 24 часов



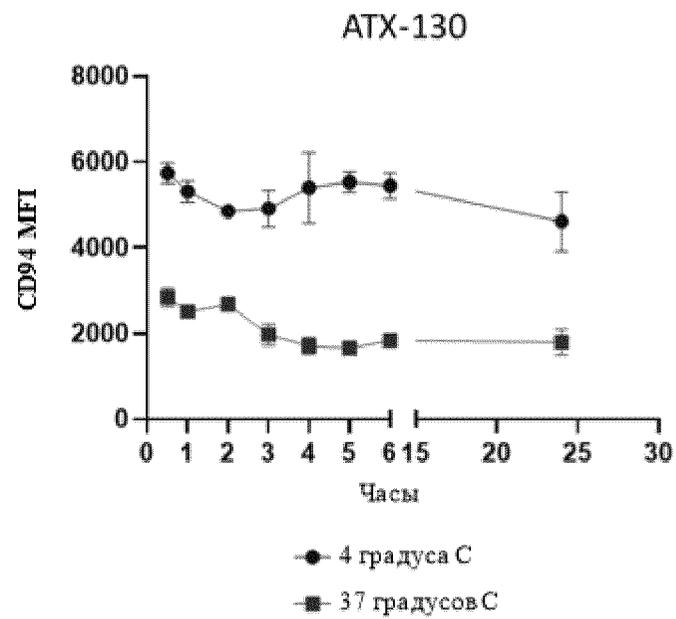
Фиг. 14



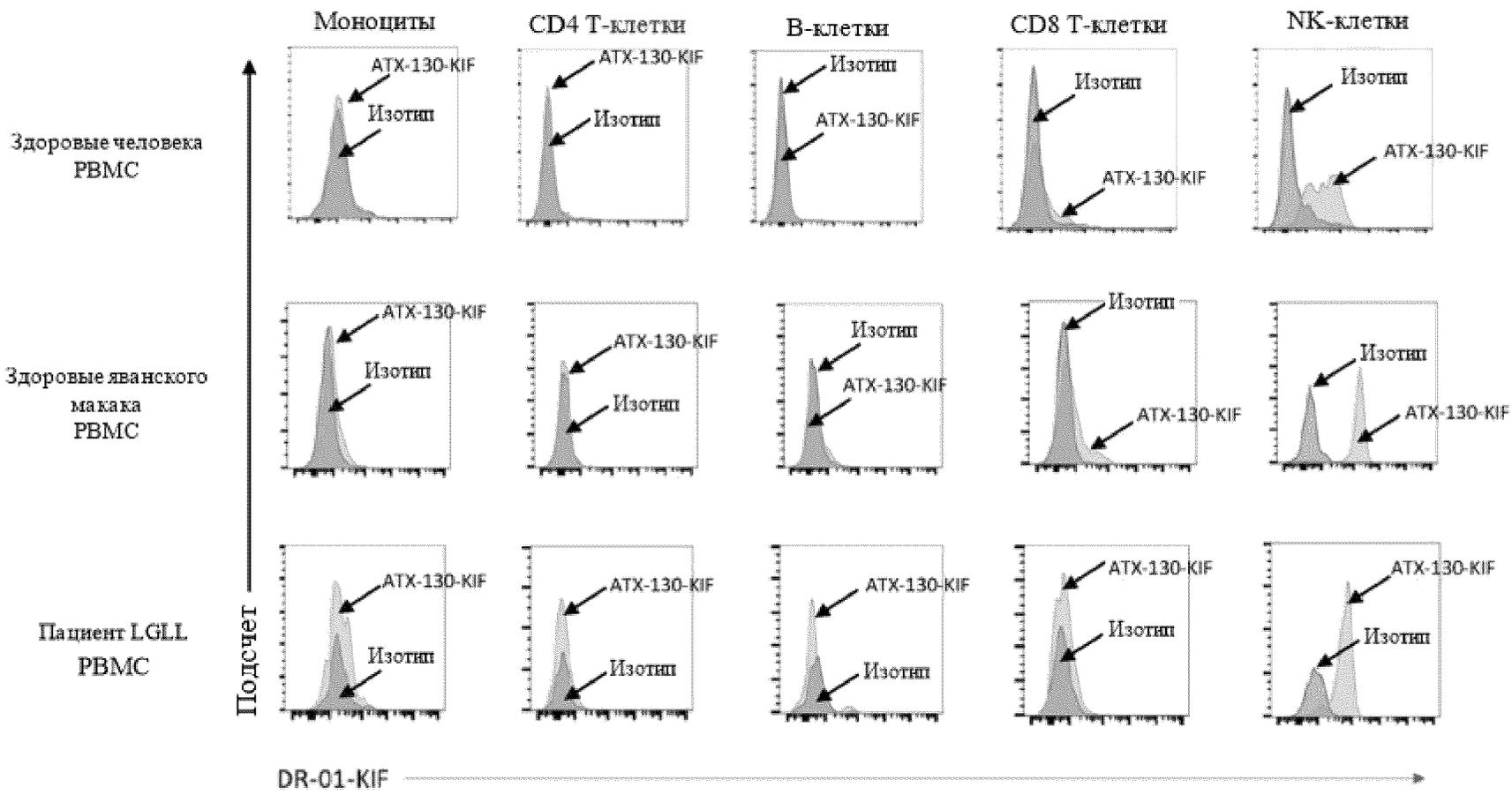
Фиг. 15



Фиг. 16

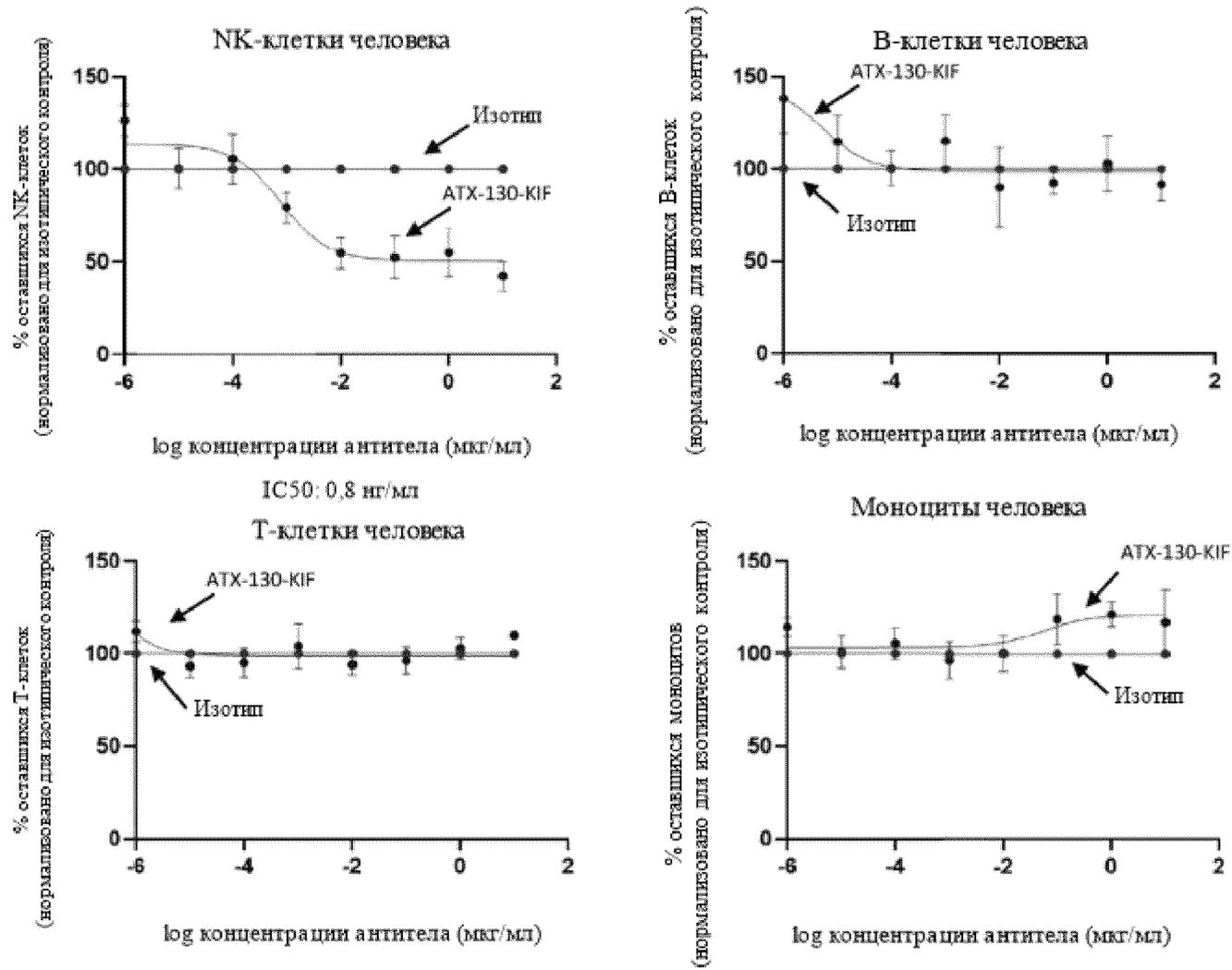


Фиг. 17

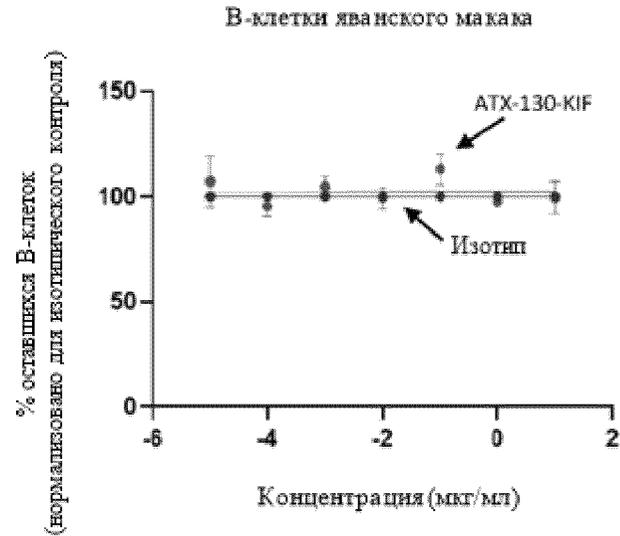
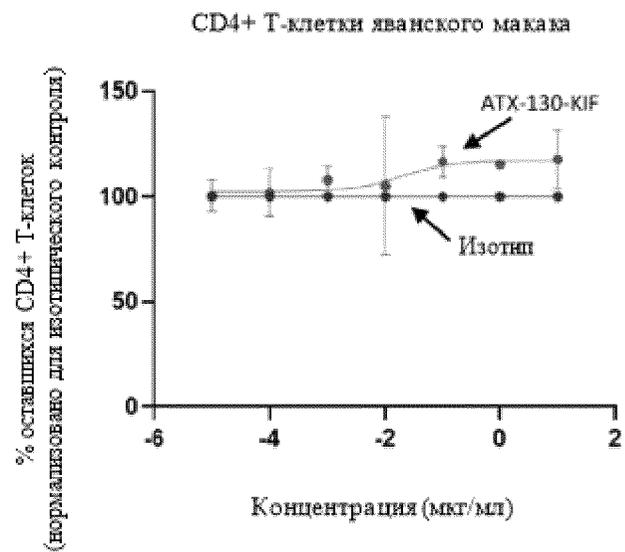


22/49

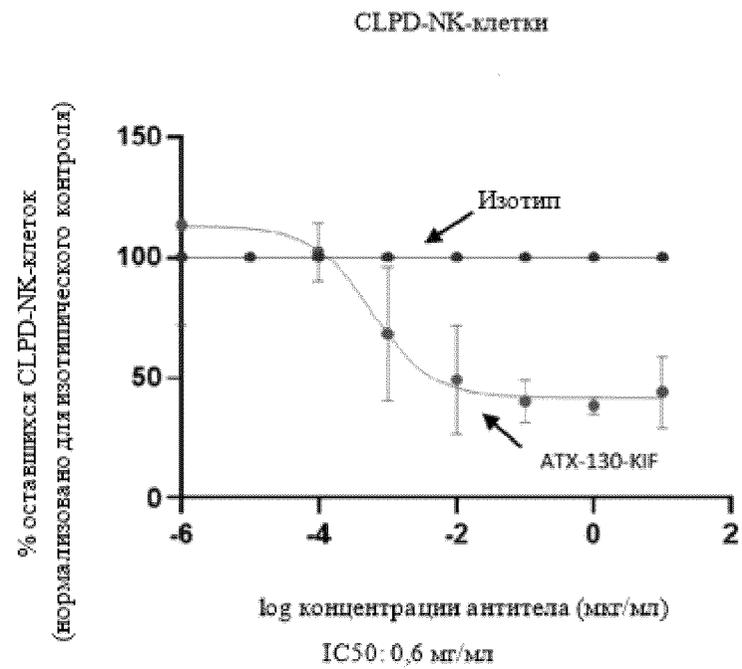
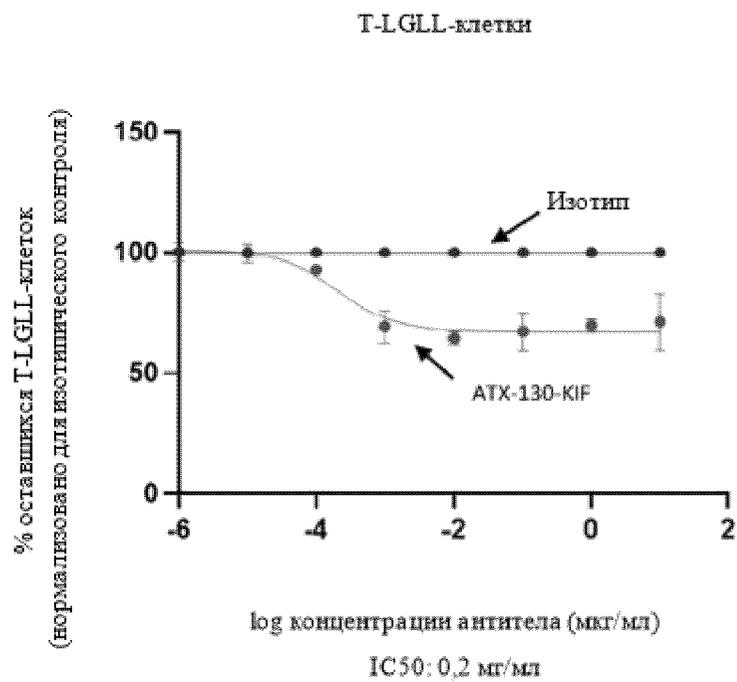
Фиг. 18



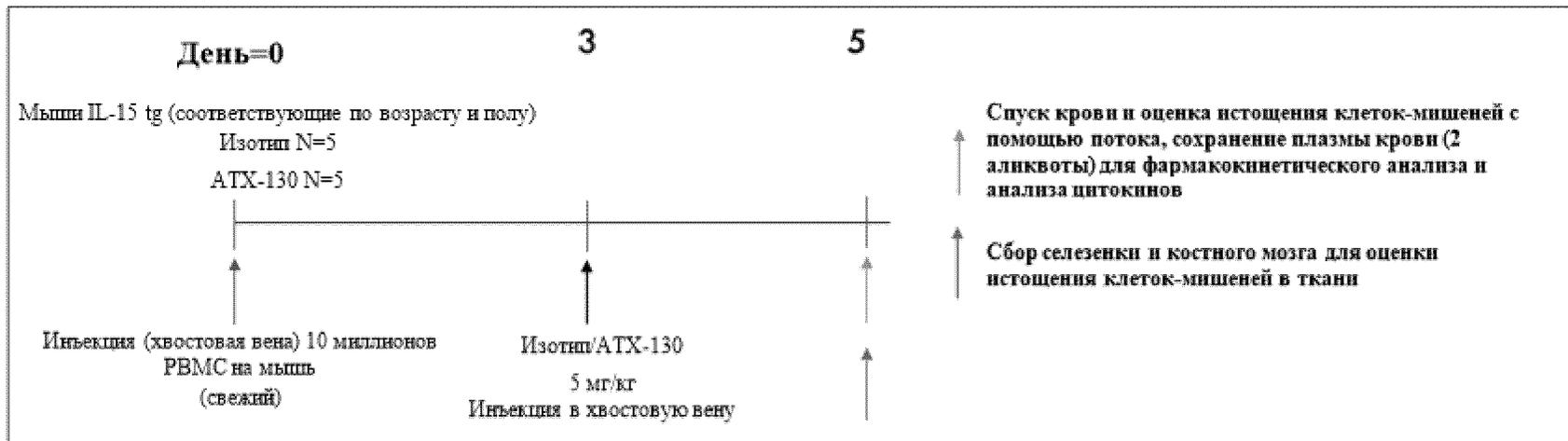
Фиг. 19



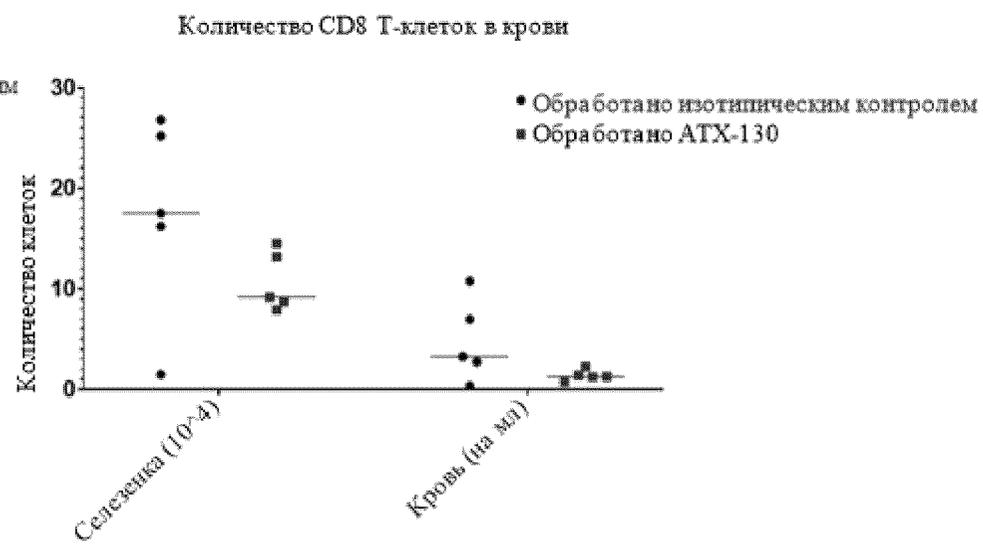
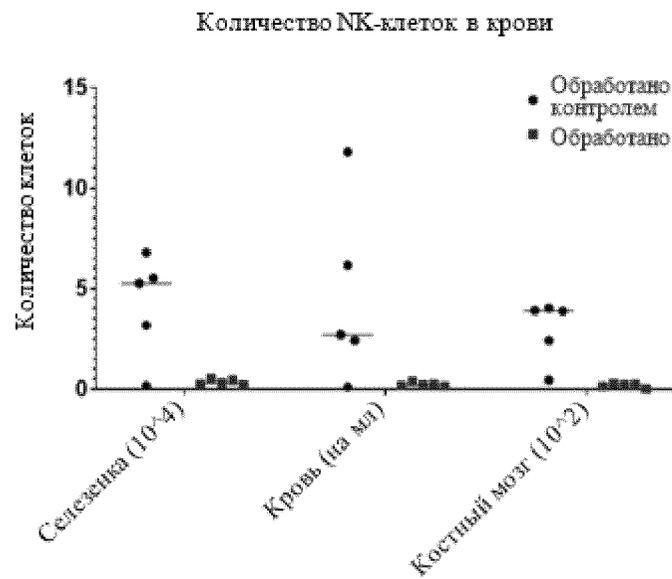
Фиг. 20



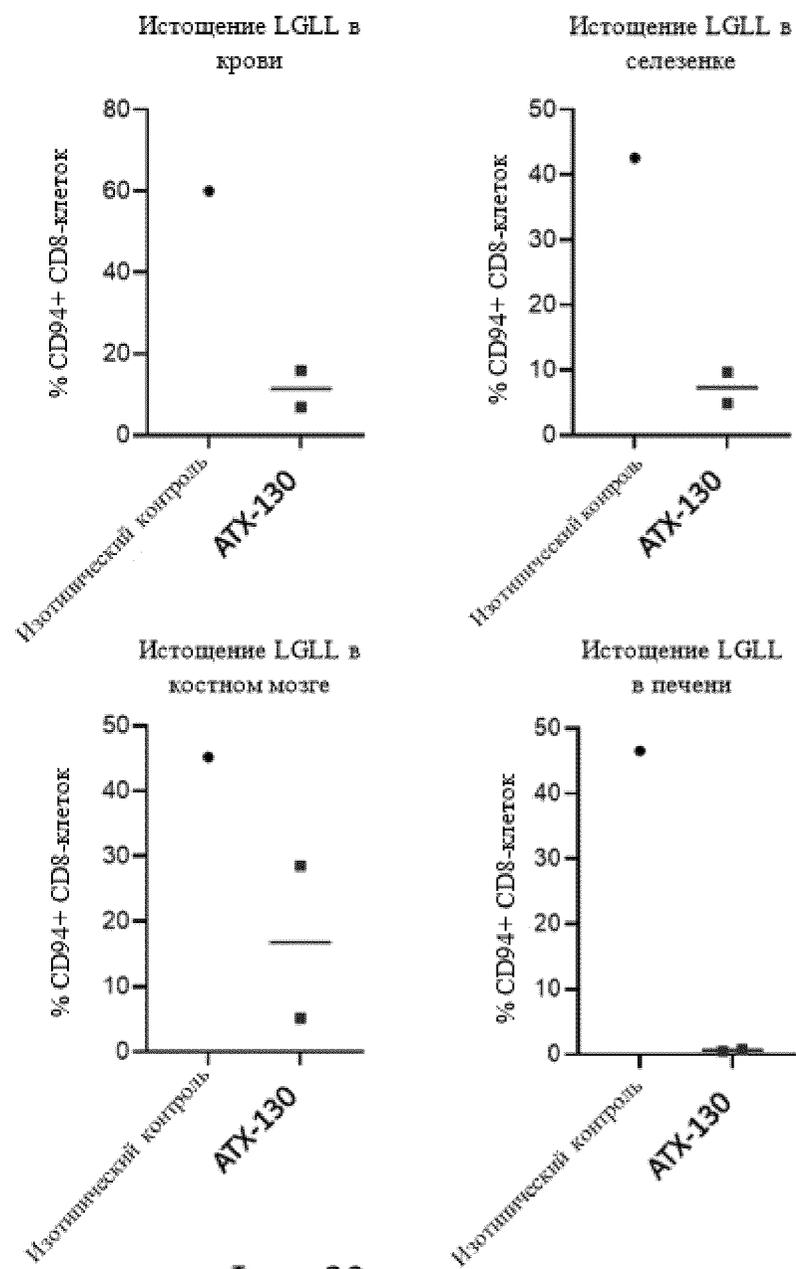
Фиг. 21



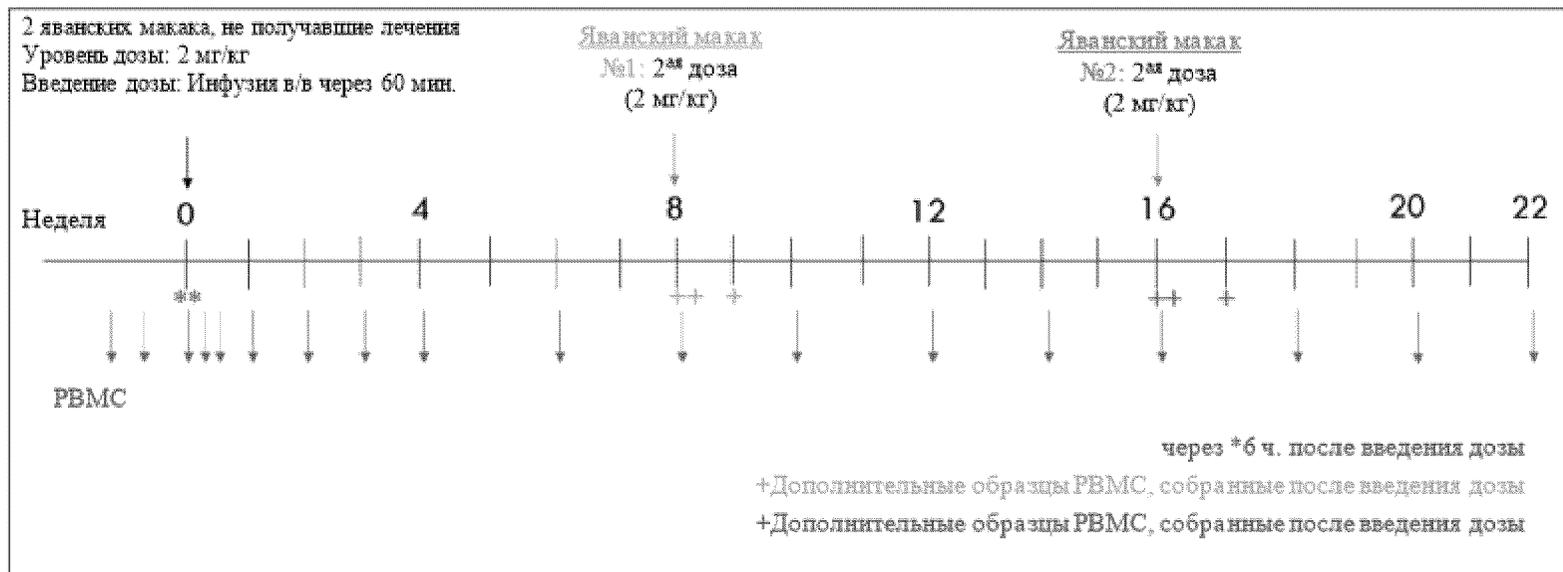
Фиг. 22А



Фиг. 22В

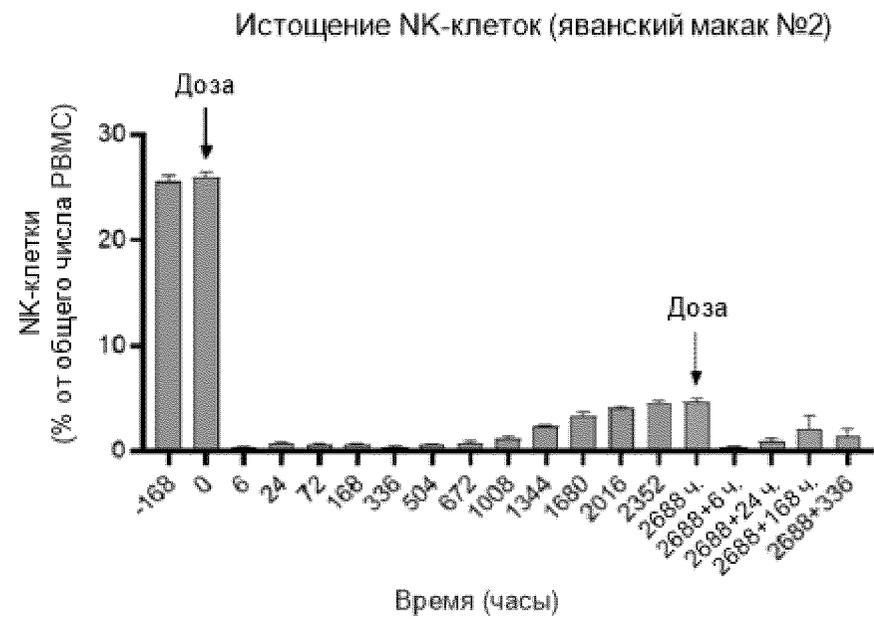


Фиг. 23

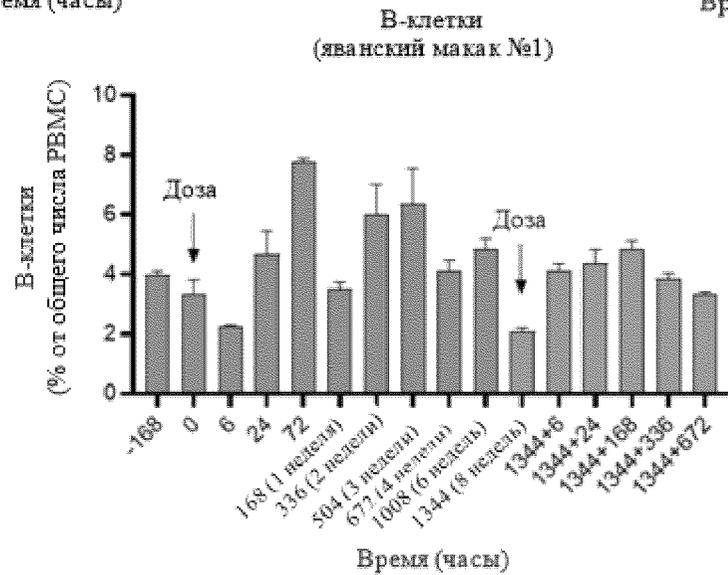
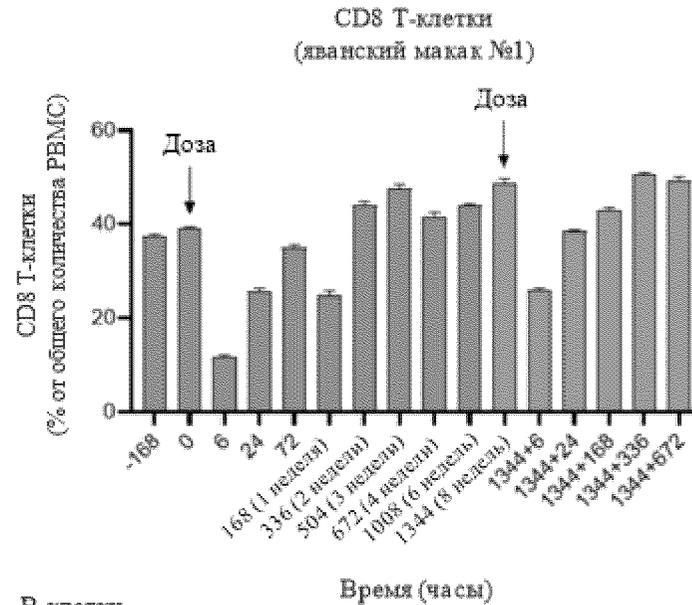
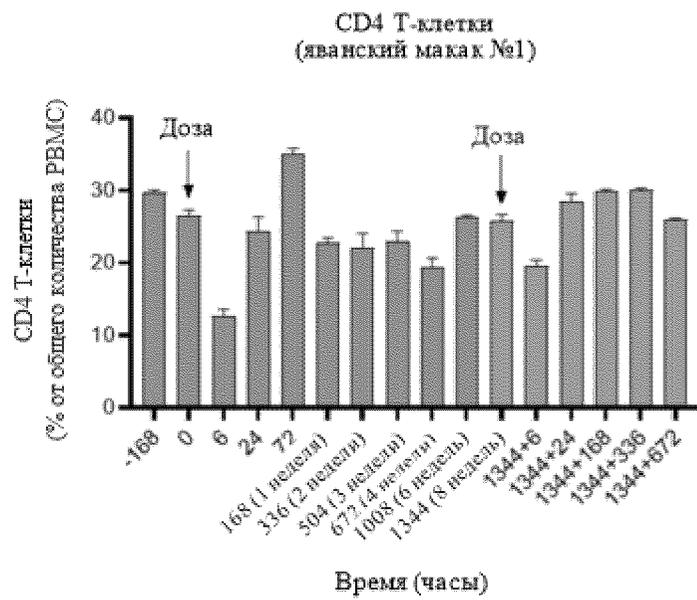


29/49

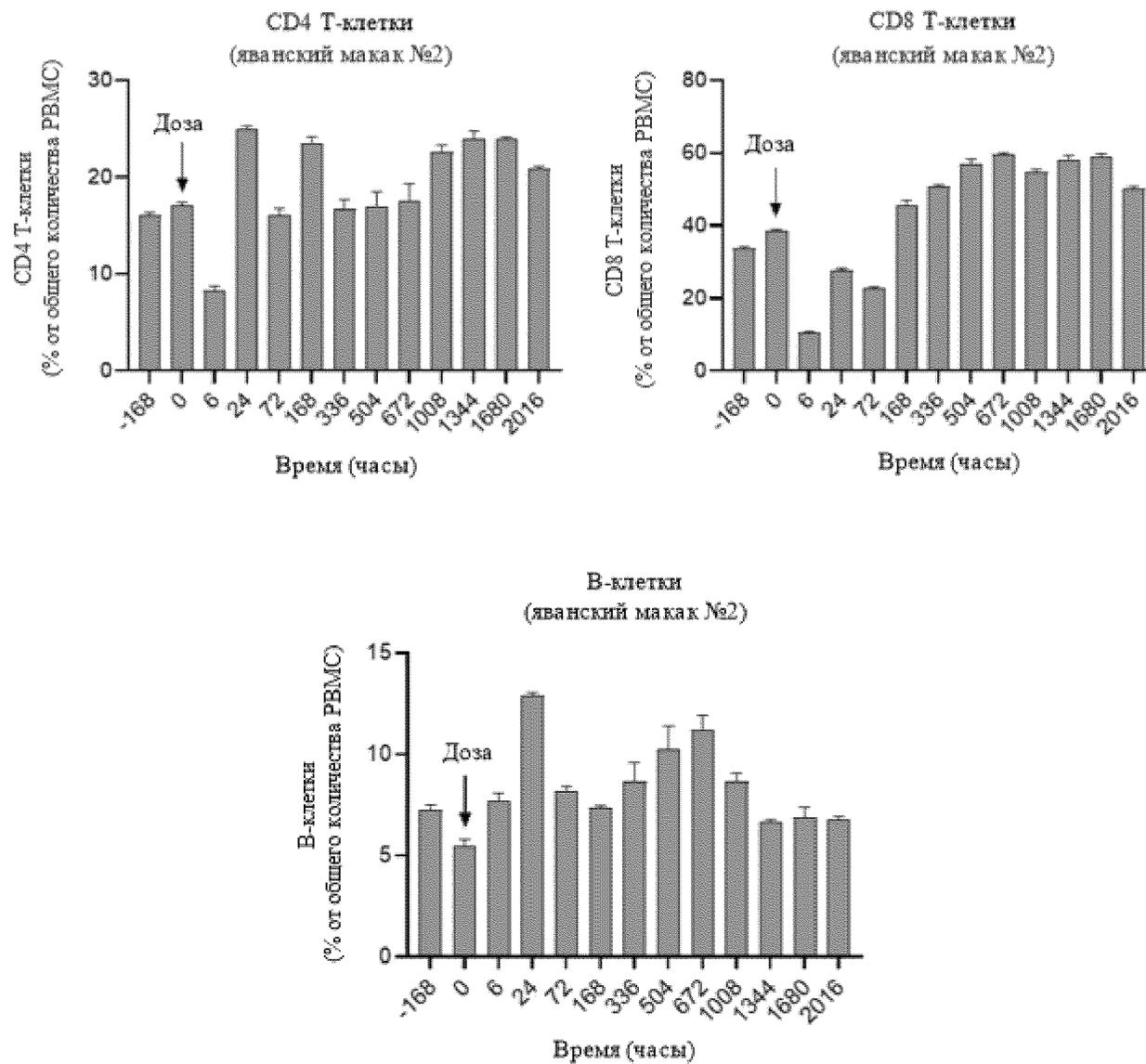
Фиг. 24А



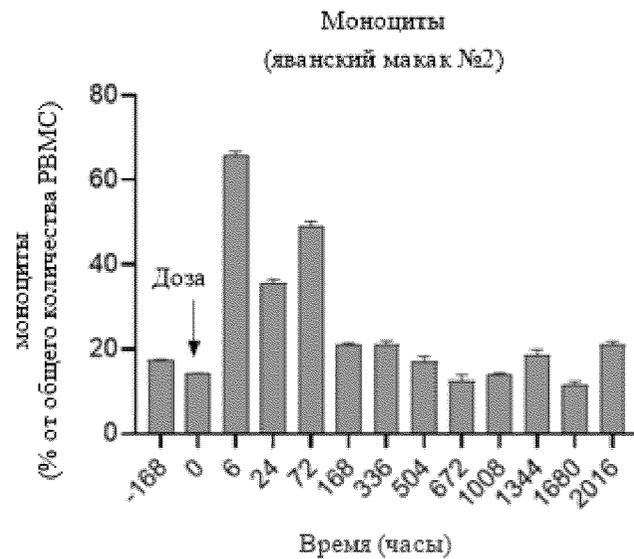
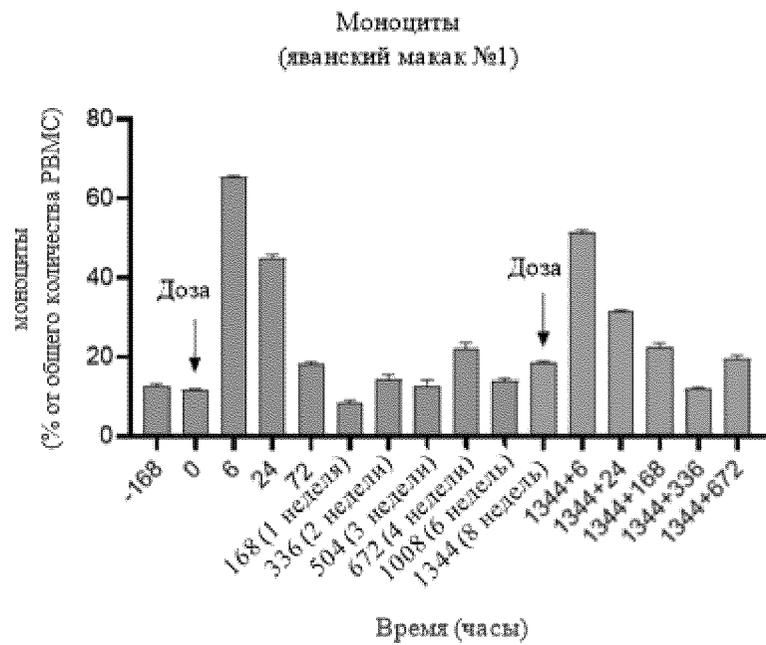
Фиг. 24В



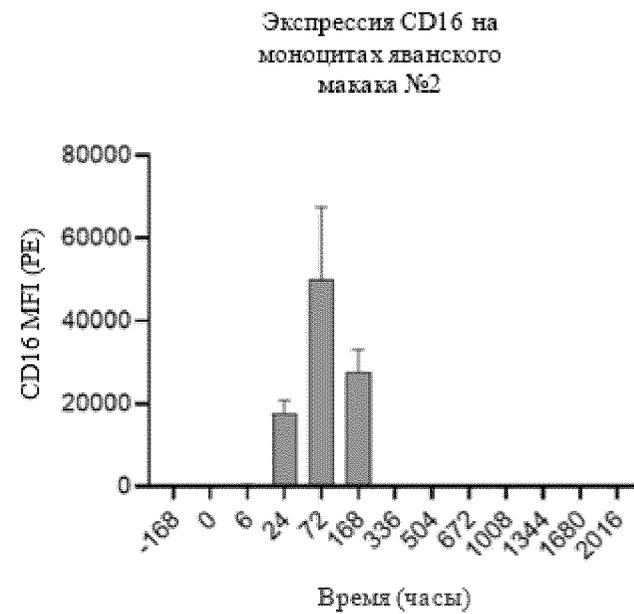
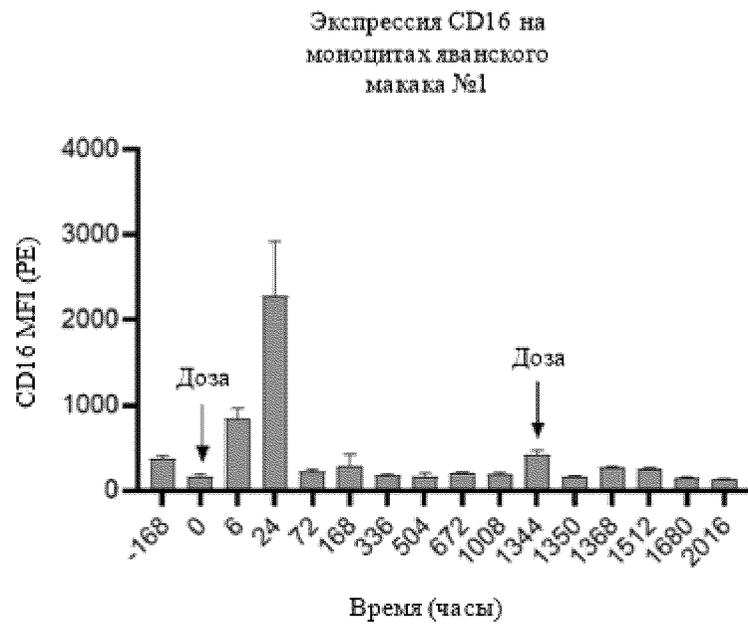
**Фиг. 25А**



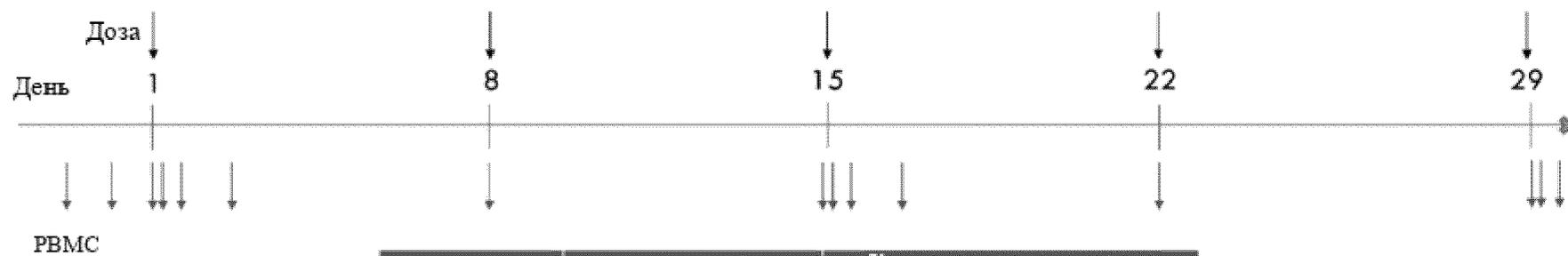
**ФИГ. 25В**



ФИГ. 26

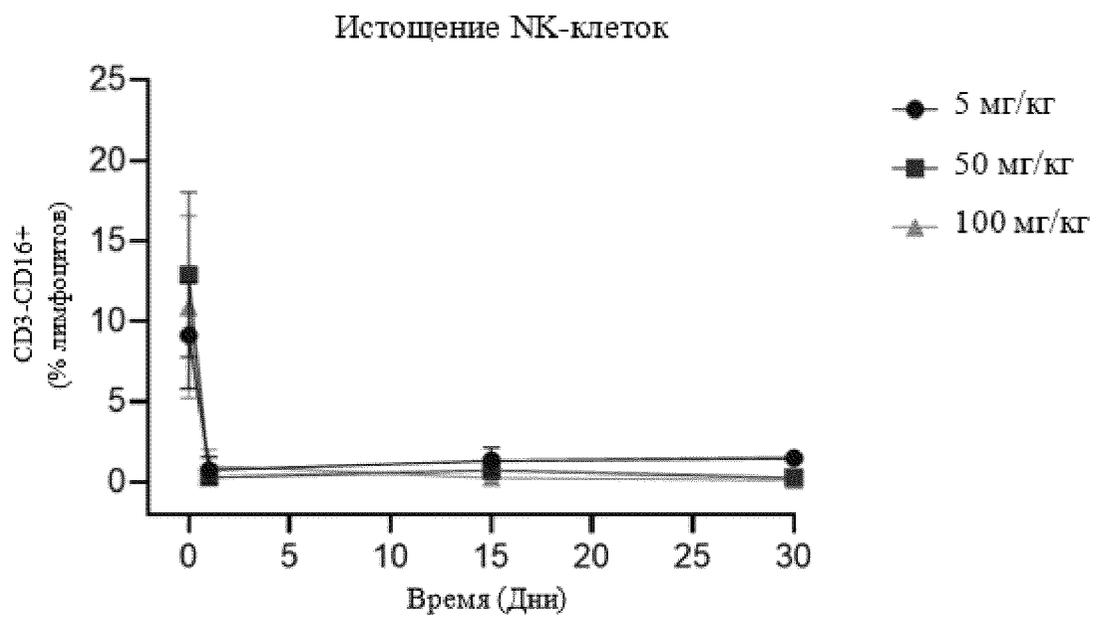


Фиг. 27

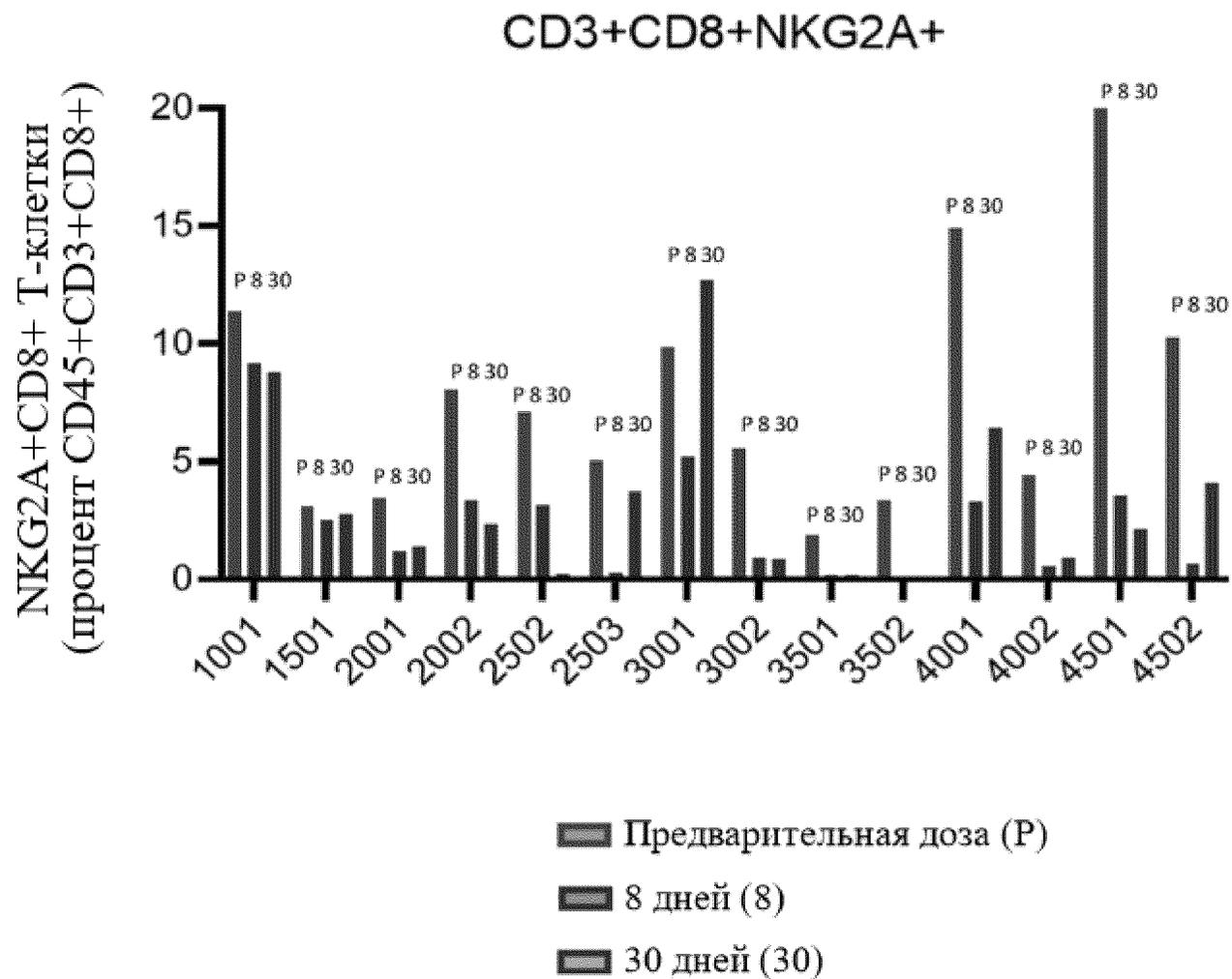


Группа	Доза (мг/кг)	Количество животных на пол (M/F)
1	0 (носитель)	1/1
2	5	2/2
3	50	2/2
4	100	2/2

Фиг. 28А



Фиг. 28В



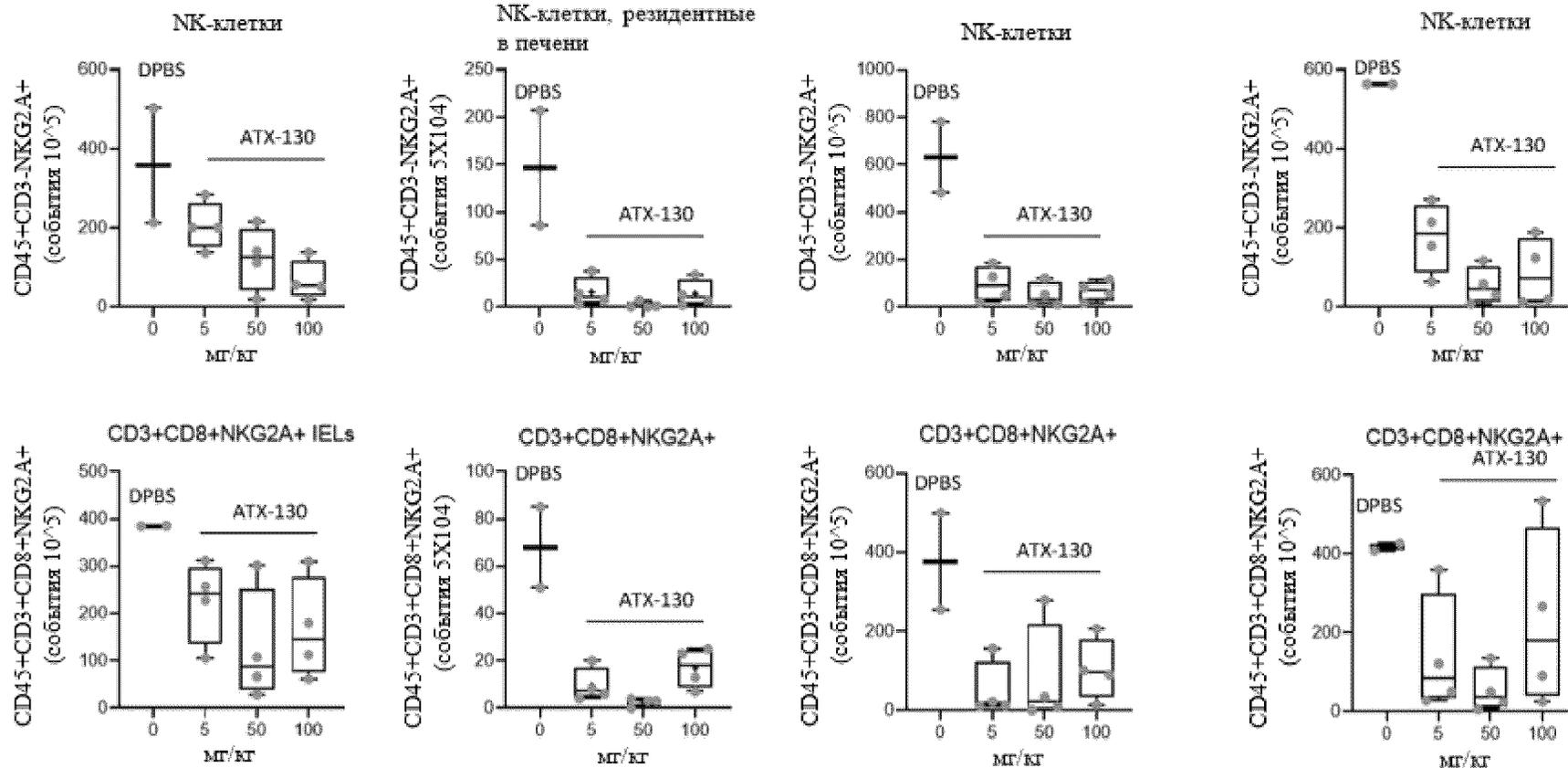
Фиг. 29

Двенадцатиперстная кишка

Печень

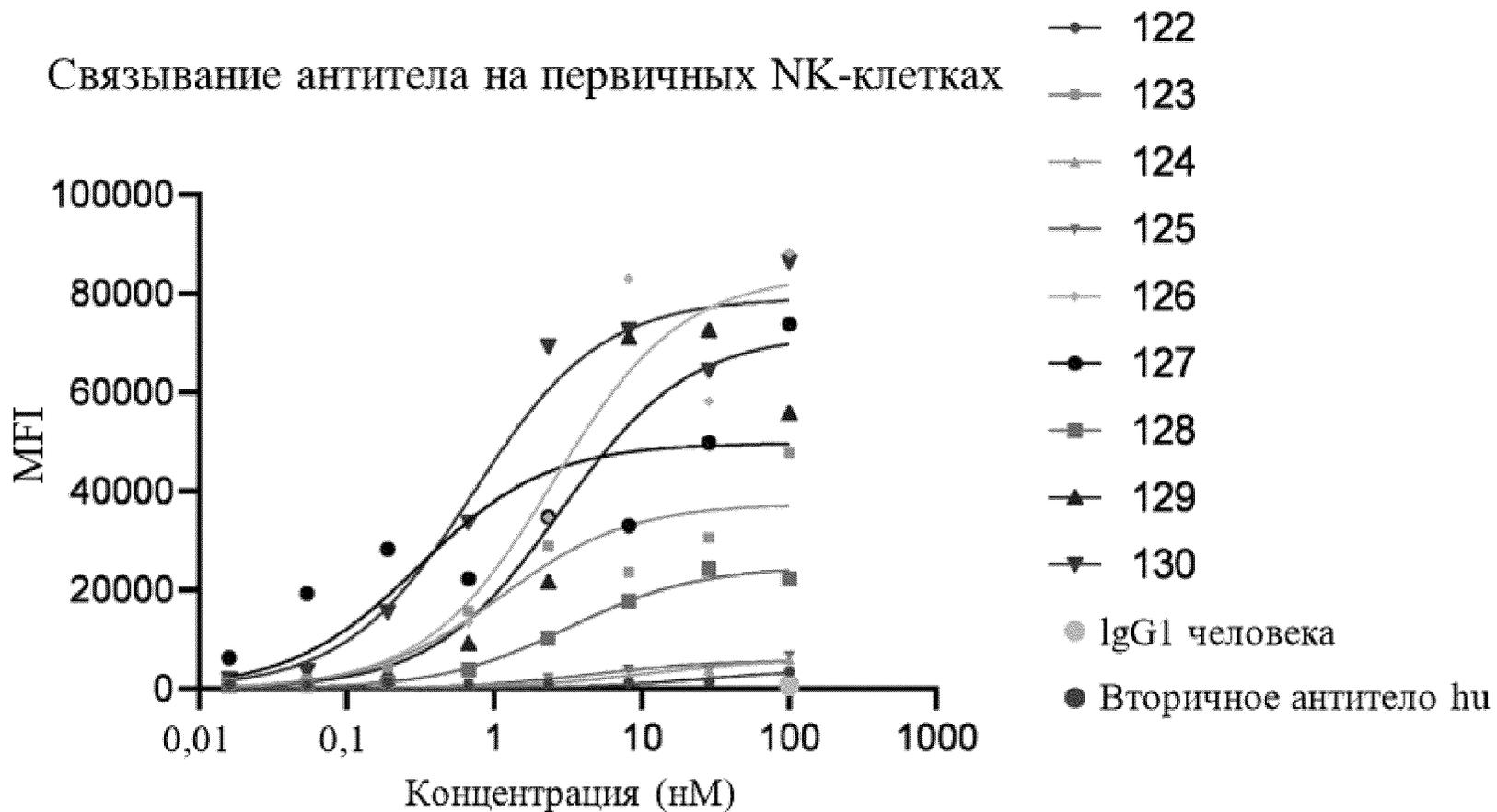
Селезенка

Костный мозг



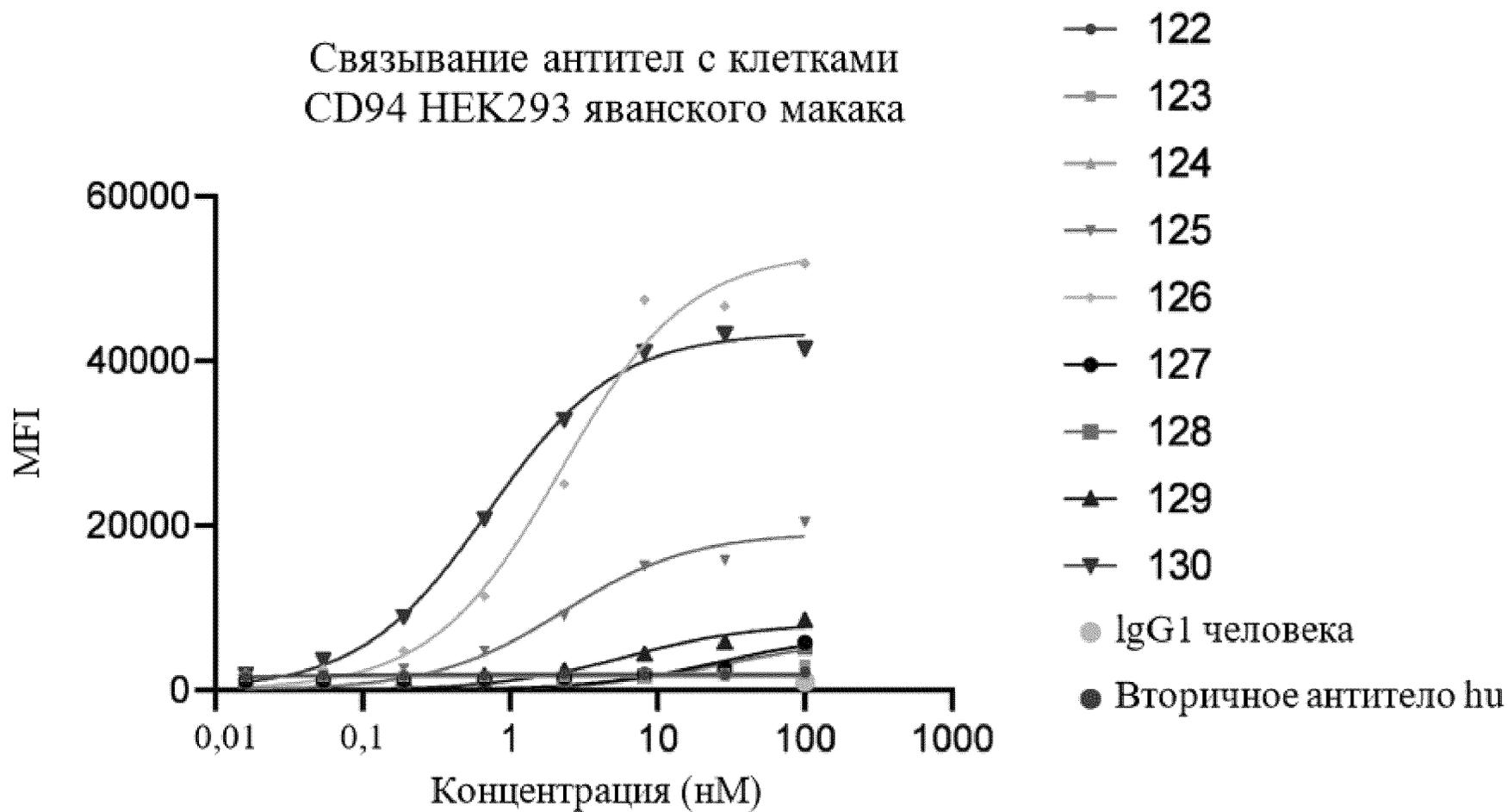
Фиг. 30

Связывание антитела на первичных НК-клетках



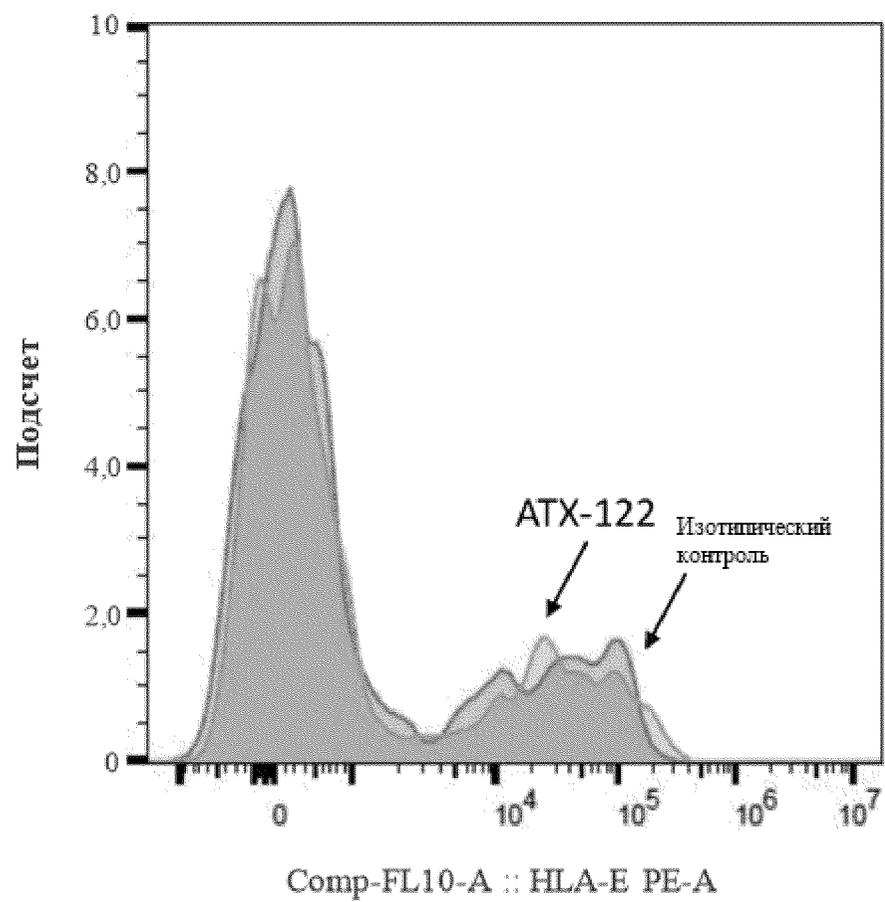
Фиг. 31А

Связывание антител с клетками  
CD94 НЕК293 яванского макака

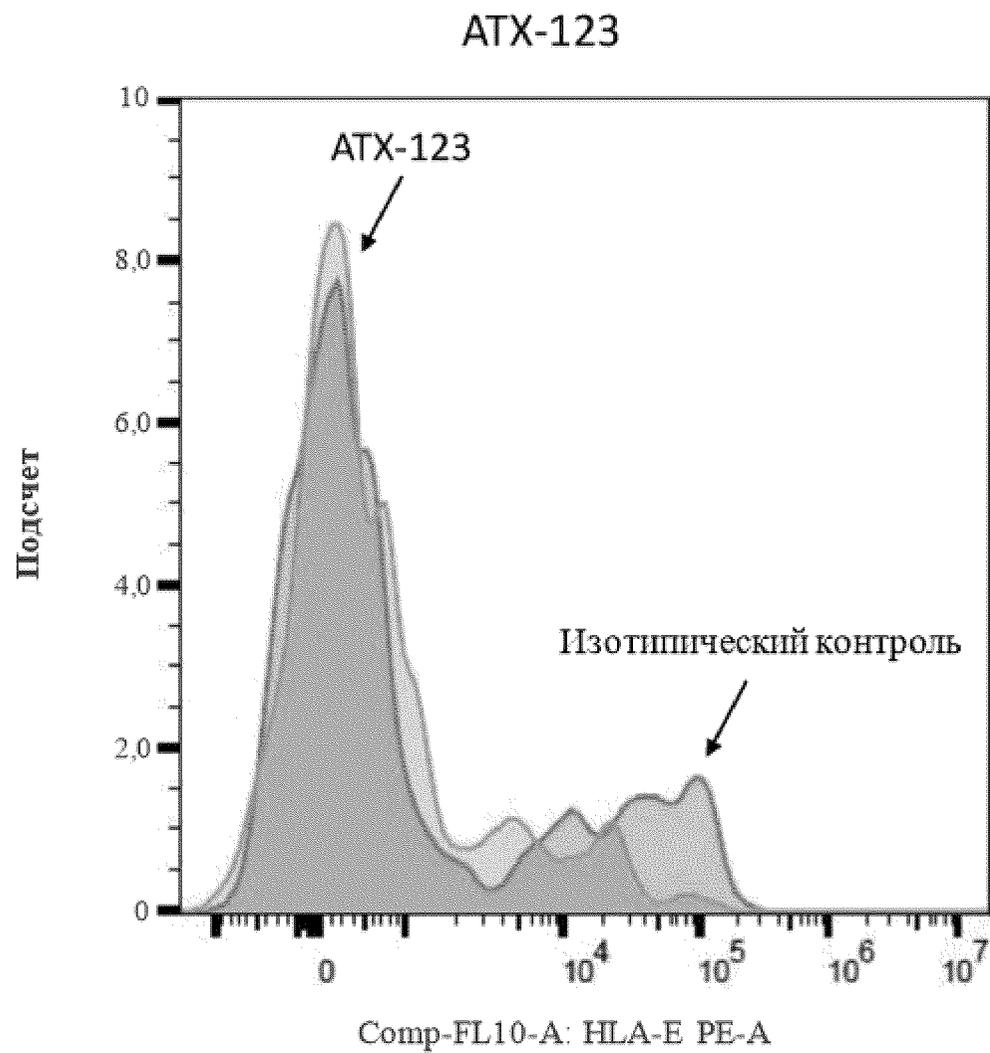


Фиг. 31В

ATX-122

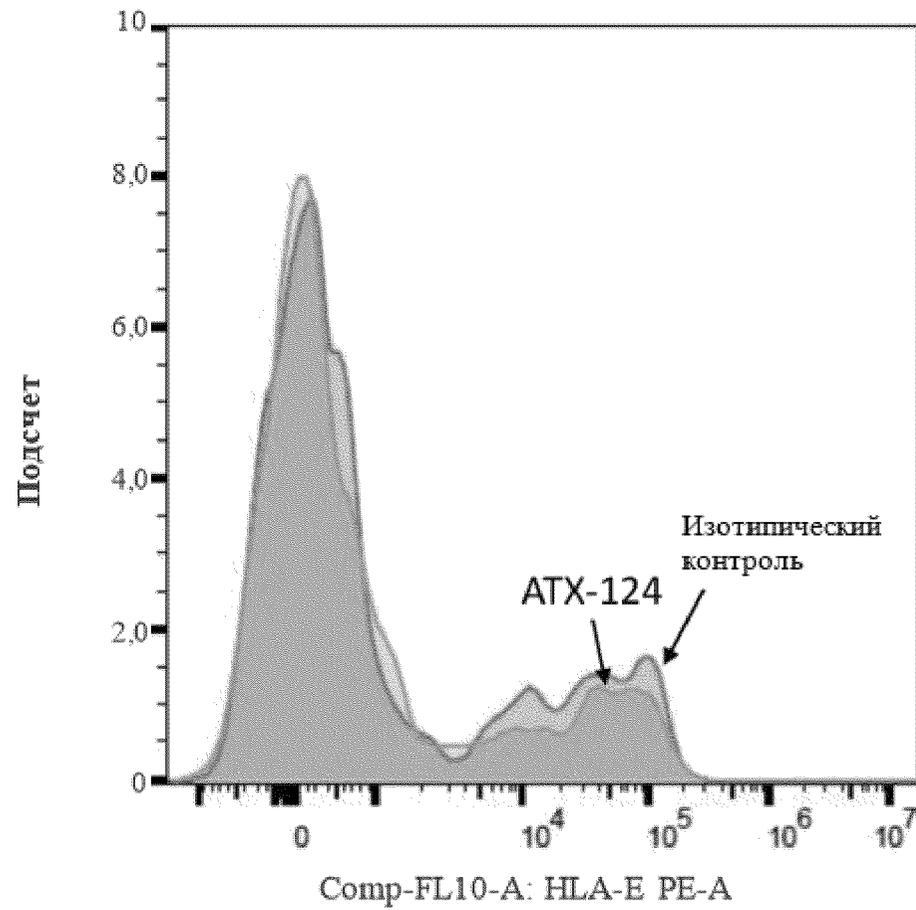


Фиг. 32А



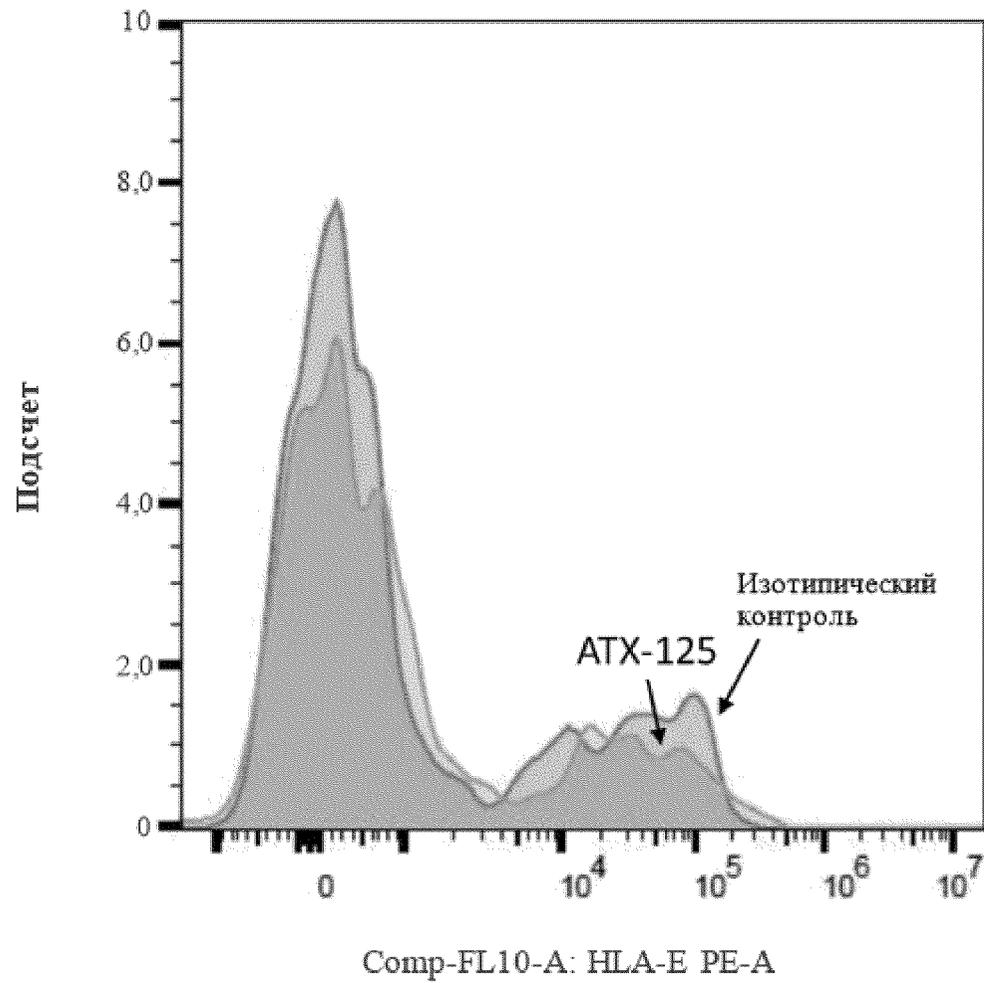
Фиг. 32В

ATX-124



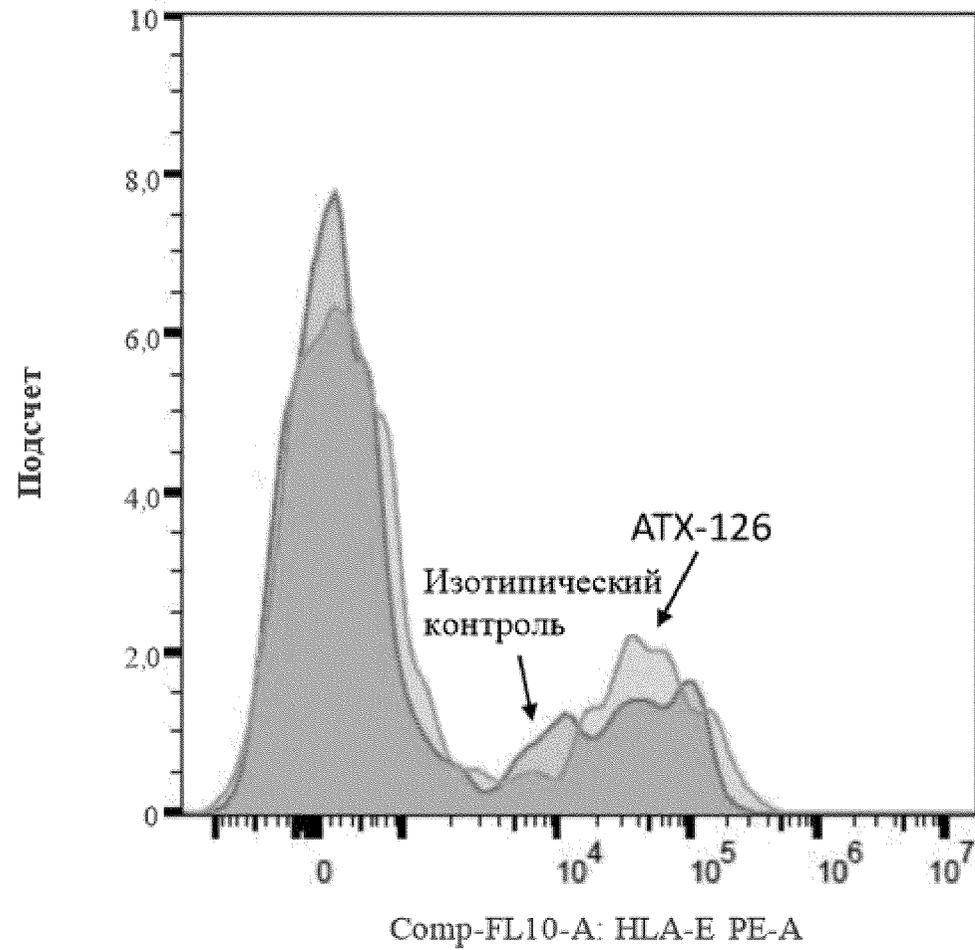
Фиг. 32С

ATX-125



Фиг. 32D

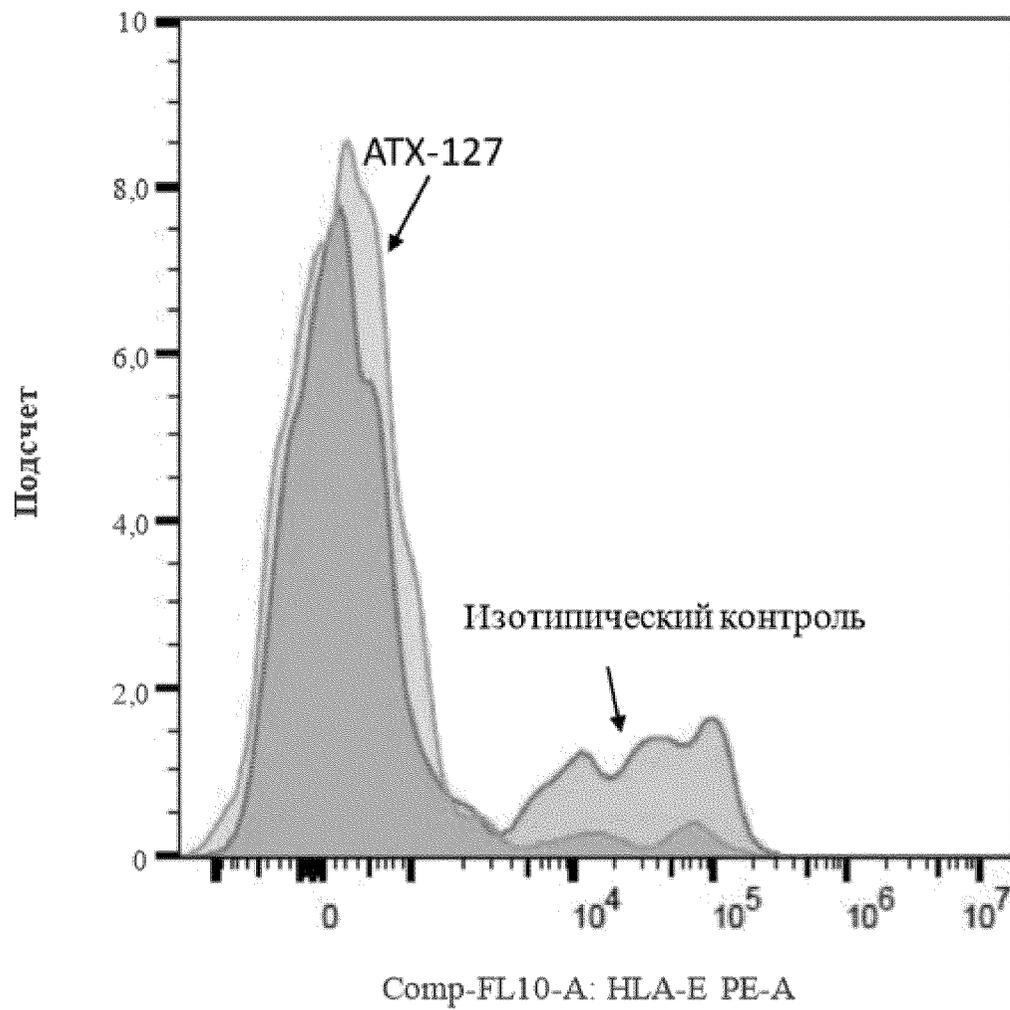
ATX-126



45/49

Фиг. 32Е

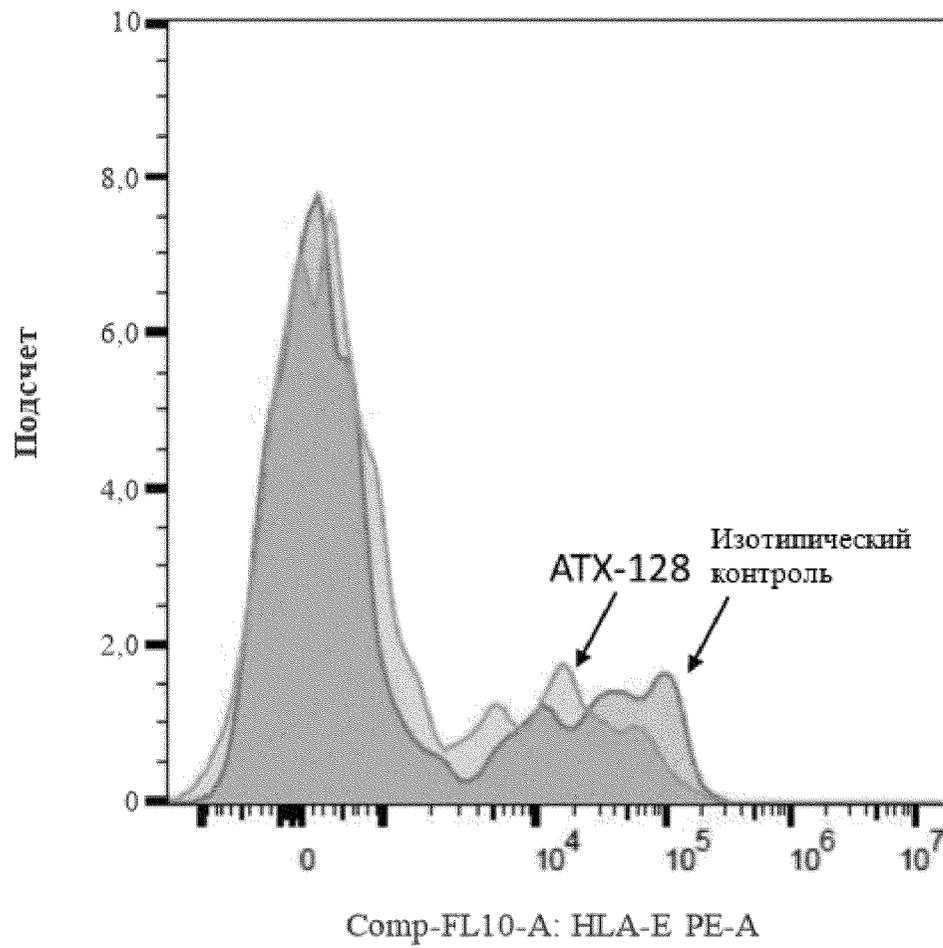
ATX-127



46/49

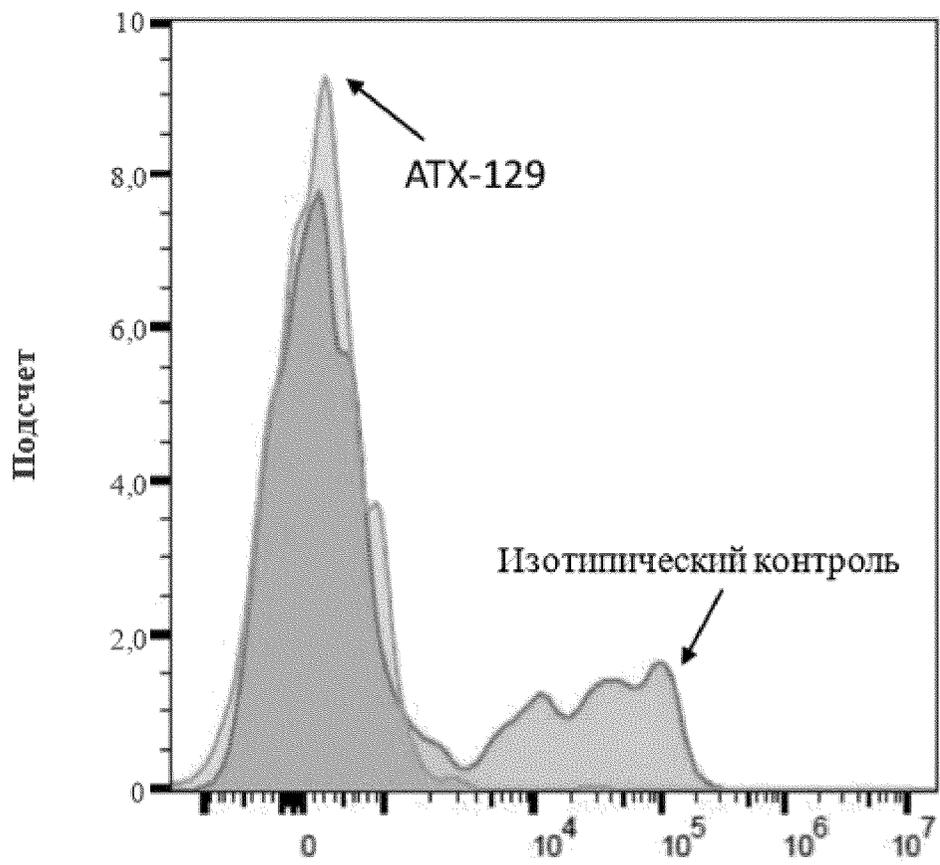
Фиг. 32F

ATX-128



Фиг. 32G

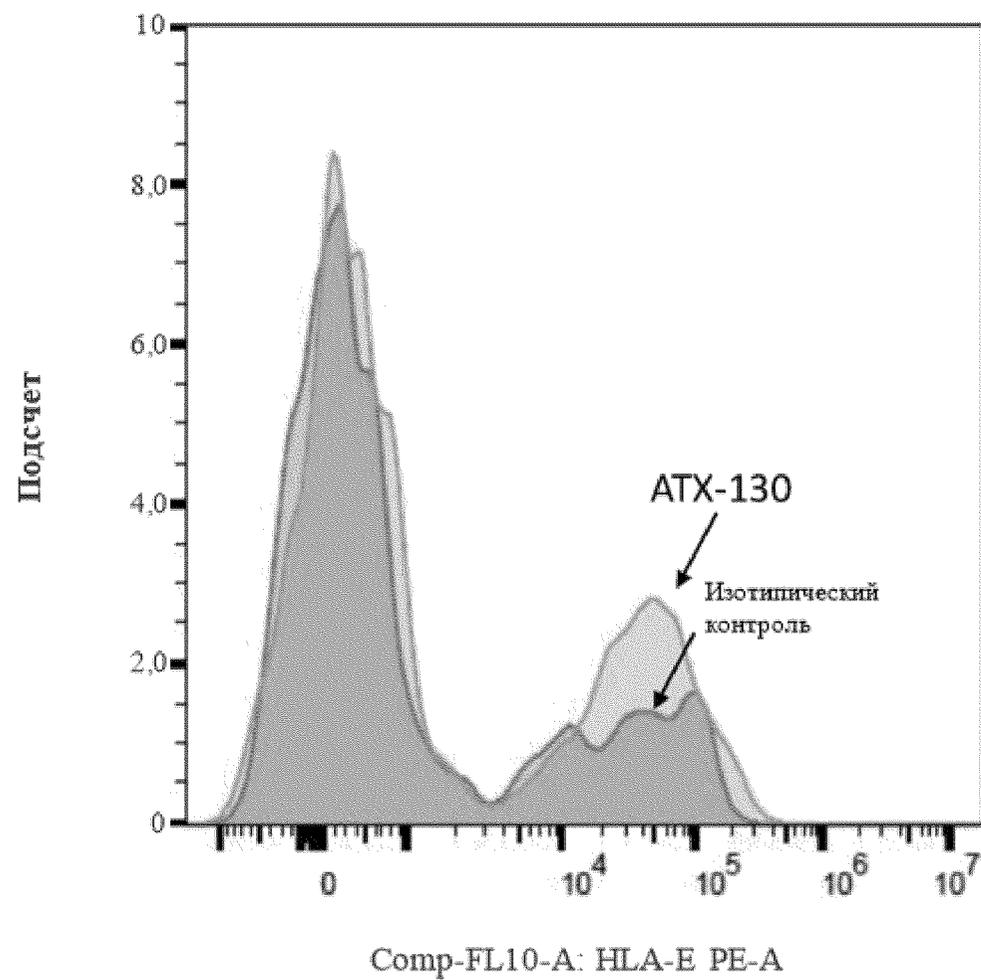
ATX-129



Comp-FL10-A: HLA-E PE-A

Фиг. 32Н

ATX-130



Фиг. 32I