

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393070** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.22

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.02

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*C12N 5/16* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)  
*C12N 15/00* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К NKG2D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 63/183,635

(32) 2021.05.04

(33) US

(86) PCT/IL2022/050453

(87) WO 2022/234571 2022.11.10

(88) 2022.12.29

(71) Заявитель:

**ИММУНОРИЗОН ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:

**Богин Орен, Дасса Лиат (IL)**

(74) Представитель:

**Кузнецова С.А. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении описан ряд антител к NKG2D. В некоторых вариантах осуществления описаны антитела к NKG2D, содержащие определенные определяющие комплементарность области (CDR). Антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения различных заболеваний, таких как рак.

**202393070**  
**A1**

**202393070**

**A1**

## **АНТИТЕЛА К NKG2D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **ДЕКЛАРАЦИЯ ДЛЯ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия упомянутого перечня в формате ASCII, созданная 2 мая 2022 г., называется P-604135-PC\_SL.txt и имеет размер 21 килобайт.

### **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0002] Настоящее изобретение относится по существу к антителам. В одном варианте осуществления в настоящем описании изложено получение и варианты применения антител к NKG2D.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0003] NKG2D (группа 2 натуральных киллерных клеток, элемент D) представляет собой активирующий белок клеточной поверхности, который преимущественно экспрессируется на цитотоксических иммунных клетках. NKG2D присутствует в большом количестве на всех НК-клетках, НКТ-клетках и подгруппах  $\gamma\delta$  Т-клеток. Хотя наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека экспрессируют NKG2D, у мышей его экспрессия повышается только после активации. CD4<sup>+</sup> Т-клетки обычно не экспрессируют NKG2D даже после активации, но у людей его экспрессия может индуцироваться при определенных патологических состояниях, таких как болезнь Крона, начинающаяся в юношеском возрасте волчанка и цитомегаловирусная инфекция. Молекулярная структура NKG2D позволяет ему связывать ряд структурно различных МНС-I-подобных лигандов. Общей особенностью лигандов NKG2D является то, что в условиях гомеостаза их экспрессия обычно низкая. Напротив, при клеточном стрессе, таком как инфекция или онкогенная

трансформация, их экспрессия может сильно индуцироваться. У людей лигандами NKG2D являются MICA, MICB и шесть членов семейства ULBP.

**[0004]** NKG2D представляет собой гомодимер из двух связанных дисульфидной связью трансмембранных белков с очень короткими внутриклеточными доменами, которые не обладают сигнальными свойствами. У мышей NKG2D используют адаптерные молекулы DAP10 и DAP12 для переключения сигнализации, тогда как у людей NKG2D ассоциируется исключительно с DAP10. DAP10 и DAP12 инициируют разные сигнальные каскады. DAP10 имеет мотив YINM, который обеспечивает связывание с p85 фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K). Кроме того, DAP10 связывается с Grb2, который ассоциируется с Vav1. DAP12 содержит иммунорецепторный тирозиновый мотив активации, который фосфорилируется Src-киназами при запуске NKG2D. Это событие обеспечивает связывание и активацию тирозинкиназ Syk и Zap70.

**[0005]** NKG2D играет важную роль в распознавании и устранении потенциально опасных клеток. Было показано, что он опосредует иммунные ответы против опухолей, инфицированных вирусами клеток и трансплантатов органов. По этой причине, первоначально считалось, что NKG2D преимущественно опосредует прямую цитотоксичность в ответ на контакт с лигандом на стрессированных клетках-мишенях. Однако в большинстве случаев NKG2D способен опосредовать активацию иммунных клеток только если такая активация происходит в воспалительном контексте. Как NK-клетки, так и Т-клетки обычно требуют вторичного сигнала, прежде чем NKG2D сможет опосредовать измеримый эффект. Таким образом, основная функция NKG2D заключается в регуляции передачи сигналов через другие рецепторы. Его уникальная особенность заключается в том, что он способен как ингибировать, так и усиливать передачу сигналов через большое число рецепторов во множестве онтологически различных подгрупп иммунных клеток и на разных стадиях жизненного цикла иммунных клеток, таких как гематопозитическое развитие, праймирование и эффекторные ответы.

[0006] NKG2D обладает большим потенциалом в качестве терапевтической мишени, поскольку он обладает способностью усиливать цитолитические иммунные ответы против важных заболеваний, таких как рак. С учетом важных функций NKG2D, существует потребность в разработке антител к NKG2D для исследования терапевтического применения NKG2D.

### ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен ряд антител к NKG2D. В одном варианте осуществления каждое из антител к NKG2D содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

[0008] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18; или

[0009] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26; или

[0010] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34; или

[0011] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

[0012] В одном варианте осуществления каждое из антител к NKG2D содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и

вариабельной области легкой цепи могут представлять собой одну из следующих пар: SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39.

[0013] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложена композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и антитело к NKG2D, описанные в настоящем документе.

[0014] В настоящем описании также предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, а также векторы и клетки-хозяева, содержащие такие полинуклеотидные последовательности.

[0015] В одном варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, таких как рак, аутоиммунные заболевания, реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD), вирусная инфекция или бактериальная инфекция. В другом варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, связанных с NKG2D. В другом варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, связанных со сверхэкспрессией NKG2D.

[0016] Эти и другие аспекты антител к NKG2D будут понятны из последующих описаний фигур и подробного описания антител к NKG2D.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0017] Некоторые варианты осуществления антител к NKG2D и варианты их применения описаны в настоящем документе только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы. В контексте деталей графических материалов следует подчеркнуть, что представленные детали приведены в качестве примера и в целях иллюстративного пояснения вариантов осуществления антител к

NKG2D и вариантов их применения. Таким образом, при изучении описания в комбинации с графическими материалами специалистам в данной области становится очевидно, как можно реализовать на практике варианты осуществления антител к NKG2D и вариантов их применения.

[0018] На **Фиг. 1А–1В** показано связывание мышинной сыворотки из анализа крови после иммунизации (ТВ) или из анализа крови до иммунизации (РВ) с рекомбинантным человеческим NKG2D-ECD-Fc (внеклеточный домен NKG2D, слитый с Fc человека). На **Фиг. 1А** показаны результаты твердофазного ИФА для связывания сыворотки крови мышей Balb/c (мыши № 8741, 8741, 8743, 8744, 8745) или мышей SJL (мыши № 8746, 8747, 8748, 8749, 8750). На **Фиг. 1В** показаны результаты FACS для связывания сыворотки крови мышей Balb/c (мыши № 8741, 8741, 8743, 8744, 8745) и мышей SJL (мыши № 8746, 8747, 8748, 8749, 8750) с NKG2D/Dap10 человека, сверхэкспрессированным в клетках CHO, или с NKG2D/Dap10 яванского макака, сверхэкспрессированным в клетках CHO, в то время как в исходных клетках CHO реактивность не наблюдалась. hIgG1: отрицательный контроль — человеческий IgG. mIgG1: отрицательный контроль — мышинный IgG. Ат к NKG2D: мАт положительного контроля hIgG.

[0019] На **Фиг. 2** перечислены идентификаторы выбранных клонов гибридомы мыши.

[0020] На **Фиг. 3** показано связывание выбранных очищенных мАт (от мАт001 до мАт020) с антигеном NKG2D-ECD-Fc по данным твердофазного ИФА.

[0021] На **Фиг. 4А–4С** показаны результаты цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) для связывания выбранных очищенных мАт (от мАт001 до мАт020) с клетками CHO, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 человека или яванского макака. На **Фиг. 4А** показано связывание с клетками CHO, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 человека. На **Фиг. 4В** показано связывание с клетками CHO, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 яванского макака. На **Фиг. 4С** показано связывание с первичными НК-клетками с

демонстрацией дозозависимого связывания для всех мАт (100 нМ, левый столбец для каждого мАт; или 10 нМ, правый столбец для каждого мАт) с различной средней интенсивностью флуоресценции (MFI). Tab KYK2.0 представляет собой положительный контроль — человеческое антитело к NKG2D типа IgG1 с мутацией LALA P329G в Fc. IgG1LALA P328G человека представляет собой человеческое антитело отрицательного контроля IgG с мутациями LALA P329G в Fc.

[0022] На Фиг. 5 обобщены данные анализа по группировкам эпитопов, выполненного с помощью твердофазного ИФА, показывающие следующие 4 разные группы: группа 1 (прямоугольник, непрерывная линия) объединяет мАт001, 002, 003, 004, 005, 006, 008, 011, 013, 015, 017, 018, 020. Группа 2 (круг, непрерывная линия) объединяет мАт007, 010, 014. Группа 3 (прямоугольник, пунктирная линия) объединяет мАт012, 016, 019. Группа 4 (круг, пунктирная линия) объединяет мАт009

[0023] На Фиг. 6А–6В показана активация НК-клеток при связывании очищенных мАт к NKG2D (от мАт001 до мАт020) при 100 нМ (левый столбец для каждого мАт) или 10 нМ (правый столбец для каждого мАт)). На Фиг. 6А показано накопление маркера активации CD107a. APC CD107A представляет собой окрашивание антителом к CD107A без связывания с клонами мАт к NKG2D, APC mIgG представляет собой антитело отрицательного контроля — IgG мыши. IM-1060 представляет собой антитело Tribody положительного контроля, IM-1091 представляет собой антитело Tribody отрицательного контроля. На Фиг. 6В показана секреция IFN-гамма. IM-1091 представляет собой антитело Tribody отрицательного контроля.

[0024] На Фиг. 7 показано ингибирование взаимодействия NKG2D-MICA (MICA — родственная полипептиду МНС класса I последовательность A) с выбранными очищенными мАт (от мАт001 до мАт020).

[0025] На Фиг. 8А показан один вариант осуществления структуры Tribody. На Фиг. 8В показан один вариант осуществления структуры ProTribody. На Фиг. 8С перечислены идентификаторы различных молекул Tribody.

[0026] На Фиг. 9 показана характеристика белков Tribody (от IM1244 до IM1251) с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.

ID ат	Название ат	Тяжелая цепь	Легкая цепь
IM1244	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D cl1 ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1245	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D cl1 ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1246	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D cl9 ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1247	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D cl9 ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1248	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D cl10 ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1249	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D cl10 ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1250	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D cl19 ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1251	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D cl19 ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1060	CD3/5T4/NKG2D(VL-VH)	h1F3.5Fd- KYK-2.0_ScFv(L-H)	h1F3.1λ-ScFv(L-H)
IM1091	CD3/5T4/NKG2D мут(VL-VH)	h1F3.5Fd- KYK-2.0 мут_ScFv(L-H)	h1F3.1λ-ScFv(L-H)

[0027] На Фиг. 10А–10Н показана характеристика белков Tribody (от IM1244 до IM1251) с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии размеров (ЭХР).

[0028] На Фиг. 11 показано связывание белков Tribody (от IM1244 до IM1251, IM1060 и IM1091) с белком NK2G по данным твердофазного ИФА. IM-1060 представляет собой антитело Tribody положительного контроля, IM-1091 представляет собой антитело Tribody отрицательного контроля.

[0029] На Фиг. 12А–12В показано связывание белков Tribody (от IM1244 до IM1251, IM1060 и IM1091) с клетками СНО, сверхэкспрессирующими белок NK2G человека (Фиг. 12А), или клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D яванского макака (Фиг. 12В). IM-1060 представляет собой антитело Tribody положительного контроля, IM-1091 представляет собой антитело Tribody отрицательного контроля.



[0030] На Фиг. 13 показана активация NK-клеток белками Tribody (IM1245, IM1246, IM1249, IM1250, IM1060 и IM1091) при 300 нМ, 60 нМ, 12 нМ и 2,4 нМ (столбцы слева направо). E + T APC-CD107 представляет собой окрашивание CD107a в отсутствие мАт к NKG2D. E APC-CD107 представляет собой окрашивание CD107 в отсутствие мАт к NKG2D и клеток-мишеней.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0031] В настоящем описании представлены выделенные антитела к NKG2D, в которых уникальные последовательности CDR из мАт к NKG2D обеспечены в гуманизованном каркасе (химерное антитело; гуманизованное антитело). Кроме того, продемонстрировано включение антигенсвязывающих областей NKG2D этих антител к NKG2D в мультивалентный антительный конструктор. Антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, потенциально могут быть использованы в качестве иммунотерапевтического лечения медицинского состояния, например рака.

[0032] Используемый в настоящем документе термин «антитело» может использоваться взаимозаменяемо с термином «иммуноглобулин», имеющим такие же качества и значения. Связывающий домен антитела или антигенсвязывающий сайт может представлять собой фрагмент антитела или генетически сконструированный продукт из одного или более фрагментов антитела, причем фрагмент участвует в специфическом связывании с антигеном-мишенью. Под «специфическим связыванием» понимается, что связывание является избирательным по отношению к интересующему антигену и может быть дискриминировано от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Например, говорят, что антитело специфически связывается с эпитопом NKG2D, когда равновесная константа диссоциации составляет  $\leq 10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  или  $10^{-7}$  М. В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может составлять  $\leq 10^{-8}$  М или  $10^{-9}$  М. В некоторых дополнительных вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может составлять  $\leq 10^{-10}$  М,  $10^{-$

<sup>11</sup> М или  $10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может находиться в диапазоне от  $\leq 10^{-5}$  М до  $10^{-12}$  М.

**[0033]** «Полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ )» означает концентрацию лекарственного средства, антитела или токсического вещества, вызывающую ответ, выраженность которого находится посередине между исходным и максимальным уровнями после указанного времени воздействия. В некоторых вариантах осуществления ответ включает аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления ответ включает функциональный ответ, например агонистический ответ. Специалисту в данной области будет понятно, что при использовании в настоящем документе в определенных вариантах осуществления измерение  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе, обеспечивает меру полумаксимального связывания антитела к NKG2D с антигеном NKG2D ( $EC_{50}$  для связывания). Специалисту в данной области будет понятно, что в настоящем документе в определенных вариантах осуществления измерение  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе, обеспечивает меру полумаксимальной эффективной концентрации антитела к NKG2D для индукции агонистического ответа ( $EC_{50}$  для функционального агонизма).

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления термин  $EC_{50}$  включает концентрацию антитела, необходимую для получения 50% агонистического ответа, который будет наблюдаться при связывании с антителом. В определенных вариантах осуществления показатель  $EC_{50}$  обычно используют в качестве показателя активности лекарственного средства, и он может в некоторых вариантах осуществления отражать связывание антитела с рецептором. В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, имеющие наномолярные показатели  $EC_{50}$  для концентрации связывания, относятся к прочно связывающимся антителам к NKG2D. В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, имеющие наномолярные показатели  $EC_{50}$  для функционального агонизма, относятся к функционально эффективным агонистическим антителам. В некоторых вариантах осуществления

антитело к NKG2D, описанное в настоящем документе, содержит вещество, прочно связывающееся с молекулой NKG2D. В определенных вариантах осуществления антитело к NKG2D, описанное в настоящем документе, представляет собой агонист молекулы NKG2D. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2D, описанное в настоящем документе, представляет собой агонист, прочно связывающийся с молекулой NKG2D.

[0035] В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в наномолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 20–40 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 40–60 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  для связывания антитела к NKG2D находится в диапазоне около 60–80 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$



[0037] В некоторых вариантах осуществления значение  $EC_{50}$ , измеряющее функциональный агонизм, в настоящем документе называется функциональным  $EC_{50}$ , и этот термин имеет все те же качества. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в наномолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 20–40 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 40–60 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 60–80 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 80–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–40 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–60 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для

антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–80 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–20 нМ.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 5–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,05–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 0,01–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный  $EC_{50}$  для антитела к NKG2D находится в диапазоне около 1–15 нМ.

**[0039]** Используемый в настоящем документе термин «антитело» охватывает фрагмент или фрагменты антитела, которые сохраняют специфичность связывания, включая, без ограничений, IgG, переменную область тяжелой цепи (VH), переменную область легкой цепи (VL), антигенсвязывающие фрагменты (Fab фрагменты),  $F(ab')_2$  фрагменты, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv

фрагменты), переменные фрагменты (Fv фрагменты), нанотело, минитела, диатела, триатела, тетратела и однодоменные антитела (см., например, Hudson and Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)). Также сюда входят гуманизированные, приматизированные и химерные антитела в значении, обычно понимаемом в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит конструктор-предшественник, в котором антигенсвязывающий сайт может быть заблокирован регуляторным доменом, причем воздействие связывающего сайта включает регулируемое воздействие в зависимости от условий окружения, например, без ограничений, воздействие микроокружения опухоли.

[0040] Используемый в настоящем документе термин «переменная область тяжелой цепи» может использоваться взаимозаменяемо с термином «домен VH» или термином «VH», имеющим все те же значения и качества. Используемый в настоящем документе термин «переменная область легкой цепи» может использоваться взаимозаменяемо с термином «домен VL» или термином «VL», имеющим все те же значения и качества. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «переменная область тяжелой цепи» или «VH» применительно к антителу охватывает фрагмент тяжелой цепи, который содержит три определяющих комплементарность области (CDR), расположенные между фланкирующими участками, называемыми каркасными областями. Каркасные области являются более высококонсервативными, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR. Аналогично, специалисту в данной области также будет понятно, что термин «переменная область легкой цепи» или «VL» применительно к антителу охватывает фрагмент легкой цепи, который содержит три CDR, расположенные между каркасными областями.

[0041] Используемый в настоящем документе термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к гиперпеременной (-ым) области (-ям) в переменной области тяжелой или легкой цепи. Начиная от N-конца, каждый из полипептидов тяжелой или легкой цепи имеет три CDR, обозначенные

«CDR1», «CDR2» и «CDR3». Кристаллографический анализ ряда комплексов антиген-антитело продемонстрировал, что аминокислотные остатки CDR образуют обширный контакт со связанным антигеном. Таким образом, области CDR в первую очередь отвечают за специфичность антигенсвязывающего сайта. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий сайт включает в себя шесть CDR, содержащих CDR из каждой варибельной области тяжелой и легкой цепей.

[0042] Используемый в настоящем документе термин «каркасная область» или «FR» относится к четырем фланкирующим аминокислотным последовательностям, которые окружают CDR варибельной области тяжелой или легкой цепи. Некоторые остатки FR могут контактировать со связанным антигеном; однако остатки FR в основном отвечают за складывание варибельной области в антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления остатки FR, ответственные за складывание варибельных областей, содержат остатки, непосредственно прилегающие к CDR. В пределах FR определенные аминокислотные остатки и определенные структурные особенности имеют очень высокую консервативность. В этом отношении все последовательности варибельных областей содержат внутреннюю дисульфидную петлю из около 90 аминокислотных остатков. Когда варибельная область складывается в антигенсвязывающий сайт, CDR открываются как выступающие петли-мотивы, которые образуют антигенсвязывающую поверхность. Общеизвестно, что существуют консервативные структурные области FR, которые влияют на форму петель CDR, сложенную в определенные «канонические» структуры, независимо от точной аминокислотной последовательности CDR. Кроме того, известно, что определенные остатки FR участвуют в нековалентных междоменных контактах, которые стабилизируют взаимодействие тяжелой и легкой цепей антитела.

[0043] Антитело может существовать в различных формах или иметь различные домены, включая, без ограничений, определяющую комплементарность область



(CDR), переменную область (Fv), домен VH, домен VL, одноцепочечную переменную область (scFv) и Fab фрагмент.

[0044] Специалисту в данной области будет понятно, что scFv представляет собой слитный полипептид, содержащий переменные области тяжелой цепи (VH) и легкой цепи иммуноглобулина, соединенные коротким линкерным пептидом. Линкер может иметь длину, например, от 10 до около 25 аминокислот.

[0045] Специалисту в данной области также будет понятно, что термин «Fab» в отношении антитела по существу охватывает часть антитела, состоящую из одной легкой цепи (как с переменной, так и с константной областями), связанной с переменной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью, тогда как «F(ab')<sub>2</sub>» содержит фрагмент тяжелой цепи, содержащий домен VH, и легкую цепь, содержащую домен VL.

[0046] В некоторых вариантах осуществления «антитело» охватывает молекулы полных антител, включая моноклональные и поликлональные антитела. В некоторых вариантах осуществления «антитело» охватывает фрагмент или фрагменты антитела, которые сохраняют специфичность связывания, включая, без ограничений, фрагменты переменной области тяжелой цепи (VH), фрагменты переменной области легкой цепи (VL), Fab-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, scFv фрагменты, Fv фрагменты, минитела, диатела, триатела и тетратела.

[0047] В одном варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, могут входить в состав биспецифического антитела. Как общеизвестно в данной области, биспецифическое антитело представляет собой рекомбинантный белок, который включает в себя антигенсвязывающие фрагменты двух разных моноклональных антител и, таким образом, способен связывать два разных антигена. В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, являются двухвалентными для NKG2D. В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, являются моновалентными для связывания NKG2D.

[0048] В одном варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, могут входить в состав мультиспецифического антитела. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой рекомбинантный белок, который включает в себя антигенсвязывающие фрагменты по меньшей мере двух разных моноклональных антител, например двух, трех или четырех разных моноклональных антител. В одном варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, могут входить в состав триспецифического антитела.

[0049] В некоторых вариантах осуществления биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела используют для иммунотерапии рака путем одновременного нацеливания на более чем одну мишень-антиген, например на цитотоксическую Т-клетку (CTL), а также на ассоциированный с опухолью антиген (ТАА), или одновременного нацеливания на компонент рецептора CTL, такой как CD3, эффекторные натуральные киллерные клетки (NK) и ассоциированный с опухолью антиген (ТАА).

#### **Антитела к NKG2D**

[0050] В настоящем описании предложен ряд антител к NKG2D. В одном варианте осуществления каждое из антител к NKG2D содержит набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и набор из трех CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[0051] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18.

[0052] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26.

[0053] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34.

[0054] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

[0055] В другом варианте осуществления антитела к NKG2D содержат последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0056] В одном варианте осуществления каждое из антител к NKG2D, представленных в настоящем документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи могут представлять собой одну из следующих пар: SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39. В другом варианте осуществления антитела к NKG2D содержат последовательности VH и VL, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0057] В одном варианте осуществления с учетом последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко использовать стандартные методики, известные в данной области, для конструирования scFv к NKG2D.

[0058] В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предложены полипептиды, содержащие домены VH и VL, которые могут быть

димеризованы в подходящих условиях. Например, домены VH и VL могут быть объединены в подходящем буфере и димеризованы посредством соответствующих взаимодействий, таких как гидрофобные взаимодействия. В другом варианте осуществления домены VH и VL могут быть объединены в подходящем буфере, содержащем фермент и/или кофактор, который может способствовать димеризации доменов VH и VL. В другом варианте осуществления домены VH и VL могут быть объединены в подходящем носителе, который позволяет им взаимодействовать друг с другом в присутствии подходящего реагента и/или катализатора.

[0059] В определенных вариантах осуществления домены VH и VL могут содержаться в более длинных полипептидных последовательностях, которые могут включать, например, без ограничений, константные области, шарнирные области, линкерные области, области Fc или области дисульфидных связей или любую их комбинацию. Константный домен представляет собой блок складывания иммуноглобулина в константной части молекулы иммуноглобулина, также называемый доменом константной области (например, CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl). В некоторых вариантах осуществления более длинные полипептиды могут содержать несколько копий одного или обоих доменов VH и VL, сгенерированных в соответствии со способом, описанным в настоящем документе; например, когда полипептиды, сгенерированные как описано в настоящем документе, используют для формирования диатела или триатела.

[0060] В одном варианте осуществления антитело к NKG2D, представленное в настоящем документе, может представлять собой IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, минитело, диатело, триатело, нанотело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело или однодоменное антитело. Например, антитело к NKG2D может представлять собой IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2D содержит IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2D

содержит IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2D содержит IgG3. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2D содержит IgG4.

[0061] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложены антитела, которые связываются с NKG2D с высокой аффинностью. В одном варианте осуществления аффинность связывания рассчитывают с помощью модификации метода Скэтчарда, описанной в публикации Frankel et al. (Mol. Immunol., 16:101-106, 1979). В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют по скорости диссоциации комплекса антиген/антитело. В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют с помощью конкурентного радиоиммунологического анализа. В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют с помощью твердофазного ИФА. В другом варианте осуществления аффинность антитела измеряют с помощью проточной цитометрии.

[0062] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложен вектор, содержащий такие полинуклеотидные последовательности. С учетом аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко создать вектор или плазмиду, кодирующую аминокислотные последовательности. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе. В зависимости от способа применения и экспериментальных условий, специалист в данной области сможет легко использовать подходящую клетку-хозяина для носительства и/или экспрессии вышеупомянутых полинуклеотидных последовательностей.

[0063] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменные

области тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложен вектор, содержащий такие полинуклеотидные последовательности. С учетом аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко создать вектор или плазмиду, кодирующую аминокислотные последовательности. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе. В зависимости от способа применения и экспериментальных условий, специалист в данной области сможет легко использовать подходящую клетку-хозяина для носительства и/или экспрессии вышеупомянутых полинуклеотидных последовательностей.

**[0064]** В таблице ниже (таблица 1) перечислены названия клонов антител к NKG2D и SEQ ID NO соответствующих VH, VL и CDR.

**[0065]** Таблица 1. SEQ ID NO, названия клонов и компоненты антител

SEQ ID NO:	Название	Компонент ат
	<b>NKG2D</b>	
1	<b>NKG2D (KYK2.0)</b>	<b>VH</b>
2		CDR1
3		CDR2
4		CDR3
5		<b>VL</b>
6		CDR1
7		CDR2
8		CDR3
9	<b>NKG2D(KYK2.0)мут</b>	<b>VH</b>
10		<b>VL</b>
11	<b>IM, NKG2D мышьяная гибридома клон- 1</b>	<b>VH</b>
12		CDR1
13		CDR2
14		CDR3
15		<b>VL</b>
16		CDR1
17		CDR2
18		CDR3

SEQ ID NO:	Название	Компонент ат
19	<b>IM, NKG2D мышинная гибридома клон- 9</b>	<b>VH</b>
20		CDR1
21		CDR2
22		CDR3
23		<b>VL</b>
24		CDR1
25		CDR2
26		CDR3
27	<b>IM, NKG2D мышинная гибридома клон- 10</b>	<b>VH</b>
28		CDR1
29		CDR2
30		CDR3
31		<b>VL</b>
32		CDR1
33		CDR2
34		CDR3
35	<b>IM, NKG2D мышинная гибридома клон- 19</b>	<b>VH</b>
36		CDR1
37		CDR2
38		CDR3
39		<b>VL</b>
40		CDR1
41		CDR2
42		CDR3

### Композиции для применения

[0066] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложена композиция, содержащая антитело к NKG2D, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для применения, хорошо известны в данной области. Например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки антител, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, которые

содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и набор из трех CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[0067] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18.

[0068] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26.

[0069] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34.

[0070] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

[0071] В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, которые имеют последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0072] В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие одну из следующих пар из вариабельной области тяжелой цепи и



вариабельной области легкой цепи: SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39.

[0073] В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности VH и VL, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0074] В некоторых вариантах осуществления композиций антитела, описанные в настоящем документе, могут иметь форму конъюгата. Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» представляет собой антитело или фрагмент антитела (такой как антигенсвязывающий фрагмент), который ковалентно связан с эффекторной молекулой или вторым белком (например, вторым антителом). Эффекторная молекула может представлять собой, например, лекарственное средство, токсин, терапевтический агент, детектируемую метку, белок, нуклеиновую кислоту, липид, наночастицу, углевод или рекомбинантный вирус. Конъюгат антитела также может называться «иммуноконъюгат». Когда конъюгат содержит антитело, связанное с лекарственным средством (например, цитотоксическим агентом), конъюгат может называться «конъюгатом антитело-лекарственное средство». Другие конъюгаты антител включают в себя, например, мультиспецифические (такие как биспецифические или триспецифические) антитела и химерные антигенные рецепторы (CAR).

[0075] Композиция, содержащая антитело к NKG2D или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть введена субъекту (например, человеку или животному) отдельно или в комбинации с носителем, т. е. фармацевтически приемлемым носителем. Под «фармацевтически приемлемым» понимают материал, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т. е. такой материал может быть введен субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов или разрушительного по своей сути взаимодействия с любым из других компонентов фармацевтической композиции, в которой он

содержится. Как хорошо известно специалистам в данной области, носитель выбирают так, чтобы свести к минимуму любое разложение полипептидов, описанных в настоящем документе, и свести к минимуму любые неблагоприятные побочные эффекты у субъекта. Фармацевтические композиции могут быть получены с помощью методики, хорошо известной в фармацевтической области.

[0076] Фармацевтические композиции, содержащие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить (например, млекопитающему, в клетку или ткань) любым подходящим способом в зависимости от того, требуется местное или системное лечение. Например, композицию можно вводить местно (например, офтальмологически, вагинально, ректально, интраназально, трансдермально и т. п.), перорально, путем ингаляции или парентерально (включая внутривенную капельницу или подкожную, внутрибрюшинную, внутриполостную, внутрикожную или внутримышечную инъекцию). Местным интраназальным введением называется доставка композиций в нос и носовые проходы через одну или обе ноздри. Композиция может быть доставлена с помощью распылительного механизма или капельного механизма или путем аэролизации. Альтернативно, введение может быть внутриопухолевым, например местной или внутривенной инъекцией.

[0077] Если композиция должна быть введена парентерально, введение обычно осуществляют путем инъекции. Инъекционные препараты могут быть получены в обычных формах либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Кроме того, парентеральное введение может включать подготовку системы медленного высвобождения или пролонгированного высвобождения для поддержания постоянной дозировки.

### **Способы применения**

[0078] В одном варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, таких как рак,

аутоиммунные заболевания, GvHd, вирусная инфекция или бактериальная инфекция. В другом варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, связанных с NKG2D. В другом варианте осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, связанных со сверхэкспрессией NKG2D.

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, обладают цитотоксической активностью. В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, являются цитотоксическими для раковых или опухолевых клеток.

[0080] В некоторых вариантах осуществления антитела к NKG2D, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способе терапии рака или опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой солидный рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой несолидный (диффузный) рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой метастаз рака или опухоли.

[0081] В настоящем документе термин «способ» относится к способам, средствам, методикам и процедурам для выполнения заданной задачи, включая, без ограничений, способы, средства, методики и процедуры, известные либо поддающиеся разработке на основе известных способов, средств, методик и процедур практикующими химиками, фармакологами, биологами, биохимиками и медицинскими специалистами.

[0082] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» или «терапия» (а также их различные формы) означают терапевтическое лечение, включая профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения, связанного с заболеванием или состоянием. Благоприятные или

желательные клинические результаты включают, без ограничений, ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания или состояния, стабилизацию заболевания или состояния (т. е. когда заболевание или состояние не усугубляется), задержку или замедление прогрессирования заболевания или состояния, облегчение или временное облегчение заболевания или состояния и ремиссию (частичную или полную) заболевания или состояния, поддающиеся или не поддающиеся выявлению. Требуемые лечения пациенты включают тех, кто уже имеет заболевание или состояние, а также тех, кто имеет предрасположенность к развитию заболевания или состояния, или тех, у кого такое заболевание или состояние необходимо предотвратить.

**[0083]** Термины «субъект», «индивидуум» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к человеку или животным, не являющимся человеком, которым проводится лечение композицией или составом с антителами к NKG2D в соответствии с настоящим описанием. Термины «не являющиеся человеком животные» и «не являющиеся человеком млекопитающие» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и включают в себя всех позвоночных, например млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы (в частности, высшие приматы), овцы, собаки, грызуны (например, мышь или крыса), морские свинки, козы, свиньи, кошки, кролики, коровы, лошади, и не относящихся к млекопитающим животных, таких как рептилии, амфибии, куры и индейки. Композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения любого подходящего млекопитающего, включая приматов, таких как обезьяны и люди, лошадей, коров, кошек, собак, кроликов и грызунов, таких как крысы и мыши. В одном варианте осуществления подлежащее лечению млекопитающее представляет собой человека. Человек может быть любым человеком любого возраста. В одном варианте осуществления человек представляет собой взрослого человека. В другом варианте осуществления человек представляет собой ребенка.

Человек может быть мужского пола, женского пола, беременной женщиной, человеком среднего возраста, подростком или пожилым человеком.

**[0084]** Фармацевтические композиции, подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают в себя композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, ослабления или облегчения симптомов заболевания или продления жизни субъекта, получающего лечение. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области.

**[0085]** Используемый в настоящем документе термин «модулирование» означает «стимулирование» или «ингибирование» активности молекулярной мишени или пути. Например, композиция модулирует активность молекулярной мишени или пути, если она стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени или пути на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере около 20%, на по меньшей мере около 25%, на по меньшей мере около 30%, на по меньшей мере около 40%, на по меньшей мере около 50%, на по меньшей мере около 60%, на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 98% или на около 99% или более по сравнению с активностью молекулярной мишени или пути в тех же условиях, но только в отсутствие композиции. В другом примере композиция модулирует активность молекулярной мишени или пути, если она стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени или пути по в меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 50 раз, в по меньшей мере 100 раз относительно активности молекулярной мишени или пути в тех же условиях, но только в отсутствие композиции. Активность молекулярной мишени или пути можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Активность молекулярной

мишени или пути можно измерять *in vitro* или *in vivo*. Например, активность молекулярной мишени или пути можно измерять *in vitro* или *in vivo* посредством соответствующего анализа, известного в данной области измерения активности. Контрольные образцы (необработанные композицией) можно принять за величину относительной активности 100%.

[0086] В одном варианте осуществления способ включает стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0087] Специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления модуляция иммунного ответа включает уменьшение воспаления или устранение воспаления в ситуации, при которой ожидаемым исходом без применения антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе, будет воспаление. Специалисту в данной области будет также понятно, что в некоторых вариантах осуществления лечение опухоли или рака включает уменьшение размера, роста и или распространения опухоли или рака по сравнению с исходом без применения антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе.

[0088] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к NKG2D, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0089] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложены варианты применения композиции, содержащей антитела к NKG2D, для лечения заболевания у субъекта. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к NKG2D, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0090] В одном варианте осуществления точное количество настоящих полипептидов или их композиций, необходимое для вызова желаемых эффектов, будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от биологического вида, возраста, пола, веса и общего состояния субъекта, конкретных полипептидов, способа введения и того, включены ли другие лекарственные средства в схему лечения. Поэтому нет возможности указать точное количество для каждой композиции. Однако конкретное количество может быть определено одним из специалистов в данной области, исходя из обычных экспериментов. Дозировки могут варьироваться, и полипептиды можно вводить в виде одной или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, или пяти или более) доз ежедневно в течение одного или более дней. Указания по подбору соответствующих доз антител можно легко найти в литературе.

[0091] В одном варианте осуществления заболевание может представлять собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, рак, аутоиммунное заболевание или иммунное расстройство. В одном варианте осуществления заболевание может представлять собой вирусные инфекции верхних дыхательных путей, легочные инфекции на ранней стадии или легочные инфекции на поздней стадии. Известно, что вирусы вызывают ряд заболеваний и рак. Примеры вирусов, вызывающих заболевания, включают, без ограничений, норовирус; ротавирус; вирус гепатита А, В, С, D или E; вирус бешенства, вирус лихорадки Западного Нила, энтеровирус, эховирус, вирус Коксаки, вирус простого герпеса (ВПГ), ВПГ-2, вирус ветряной

оспы, вирусы, переносимые комарами, арбовирус, вирус энцефалита Сент-Луиса, вирус калифорнийского энцефалита, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), полиовирус, вирус Зика, вирус краснухи, цитомегаловирус, вирус папилломы человека (ВПЧ), энтеровирус D68, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома, коронавирус-2 SARS, вирус Эпштейна — Барр, вирус гриппа, респираторно-синцитиальный вирус, полиомавирусы (такие как вирус JC, вирус BK), вирус Эбола, вирус Денге или любую их комбинацию.

[0092] В другом варианте осуществления заболевание представляет собой рак, который может представлять собой, без ограничений, карциному, саркому, лимфому, лейкоз, герминогенную опухоль, бластому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, остеосаркому, рабдомиосаркому, рак сердца, рак головного мозга, астроцитому, глиому, медуллобластому, нейробластому, рак молочной железы, медуллярную карциному, аденокортикальную карциному, рак щитовидной железы, карциному из клеток Меркеля, рак глаза, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гепатоцеллюлярный рак, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, почечно-клеточный рак, рак предстательной железы, рак яичек, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак головы, рак шеи, карциному носоглотки, рак кроветворной системы, неходжкинскую лимфому, рак кожи, базальноклеточную карциному, меланому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого или любую их комбинацию.

[0093] Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают, без ограничений, артрит (ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагра или подагрический артрит, острый подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит,



дегенеративный артрит, артрит, индуцированный коллагеном II типа, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориазический артрит, болезнь Стилла, вертебральный артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит и анкилозирующий спондилит), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопия, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетиформный дерматит, нуммулярный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный раздражающий контактный дерматит и атопический дерматит, X-сцепленный синдром гипер-IgM, аллергические внутриглазные воспалительные заболевания, крапивница, такая как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, миозит, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (включая системную склеродермию), склероз, такой как системный склероз, рассеянный склероз (РС), такой как спинооптический РС, первично-прогрессирующий РС (ППРС), и рецидивирующий ремиттирующий рассеянный склероз (PPPC), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, диссеминированный склероз, атаксический склероз, оптиконевромиелит (NMO), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона, аутоиммунно-опосредованные желудочно-кишечные заболевания, колит, такой как ulcerативный колит, язвенный колит, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), воспаление кишечника, гангренозная пиодермия, узловатая эритема, первичный склерозирующий холангит,

респираторный дистресс-синдром, в том числе у взрослых, или острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глаза, ирит, хориоидит, аутоиммунное гематологическое заболевание, ревматоидный спондилит, ревматоидный синовит, наследственный ангионевротический отек, поражение черепных нервов, как при менингите, герпес беременных, пемфигоид беременных, зуд мошонки, аутоиммунный синдром истощения яичников, внезапная потеря слуха из-за аутоиммунной патологии, IgE-опосредованные заболевания, такие как анафилаксия и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический и/или стволовой энцефалит, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом или без него, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный ГН, иммуноопосредованный ГН, мембранозный ГН (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный ГН или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембрано- или мембранозно-пролиферативный ГН (МПГН), включая тип I и тип II, и быстро прогрессирующий ГН, пролиферативный нефрит, аутоиммунная полигландулярная эндокринная недостаточность, баланит, включая циркумкрипталый плазмацеллюлярный баланит, баланопостит, кольцевидная центробежная эритема, стойкая дисхромическая эритема, мультиформная эритема, кольцевидная гранулема, блестящий лишай, склеротический и атрофический лишай, простой хронический лишай, спинулезный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предраковый кератоз, гангренозная пиодермия, аллергические состояния и ответы, аллергическая реакция, экзема, включая аллергическую или атопическую экзему, астеатозную экзему, дисгидротическую экзему и везикулярную ладонно-подошвенную экзему, астму, такую как бронхиальная астма, бронхиальная астма и аутоиммунная астма, состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как группы крови

плода А-В-0 во время беременности, хроническое воспалительное заболевание легких, аутоиммунный миокардит, нарушение адгезии лейкоцитов, волчанка, включая волчаночный нефрит, волчаночный церебрит, детскую волчанку, непечечную волчанку, внепечечную волчанку, дискоидную волчанку и дискоидную красную волчанку, волчаночную алопецию, системную красную волчанку (СКВ), такую как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, синдром неонатальной волчанки (НКВ) и диссеминированную красную волчанку, ювенильный сахарный диабет (типа I), включая детский инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД), и сахарный диабет взрослых (диабет II типа). Также предусмотрены иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, саркоидоз, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулиты, включая васкулит, васкулит крупных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гиганто-Т-клеточный артериит (Такаясу)), васкулит средних сосудов (включая болезнь Кавасаки и узелковый полиартериит / узелковый периартериит), микроскопический полиартериит, иммуноваскулит, васкулит ЦНС, кожный васкулит, васкулит гиперчувствительности, некротический васкулит, такой как системный некротический васкулит, и ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA) васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS) и ANCA-ассоциированный васкулит мелких сосудов, височный артериит, апластическая анемия, аутоиммунная апластическая анемия, положительная анемия Кумбса, анемия Даймонда-Блэкфана, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), болезнь Аддисона, аутоиммунная нейтропения, панцитопения, лейкопения, заболевания, связанные с диапедезом лейкоцитов, воспалительные заболевания ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром полиорганного поражения, например вторичный по отношению к септицемии, травме или кровоизлиянию, заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело, анти-БМК-нефрит, синдром

антифосфолипидных антител, аллергический неврит, болезнь/синдром Бехчета, синдром Кастлемана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса — Джонсона, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и кожный пемфигоид, пузырчатка (включая пузырчатку обыкновенную, пузырчатку листовидную, пемфигоид слизисто-мембранной пузырчатки и эритематозную пузырчатку), аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, термическая травма, преэклампсия, расстройства, связанные с иммунными комплексами, такие как иммуннокомплексный нефрит, антитело-опосредованный нефрит, полиневропатии, хронические невропатии, такие как IgM-полиневропатии или IgM-опосредованная невропатия, аутоиммунная или иммуноопосредованная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), включая хроническую или острую ИТП, склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит, аутоиммунные заболевания яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз, гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, болезнь Грейвса, полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные полигландулярные синдромы (или синдромы полигландулярной эндокринопатии), паранеопластические синдромы, включая неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта — Итона или синдром Итона — Ламберта, синдром скованного человека или синдром ригидного человека, энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), миастения гравис, например тимома-ассоциированная миастения гравис, дегенерация мозжечка, нейромиотония, опсоклонус или синдром опсоклонус-миоклонус (ОМС), и сенсорная нейропатия, мультифокальная моторная нейропатия, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гиганто-Т-клеточный гепатит, хронический активный гепатит

или аутоиммунный хронический активный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (ЛИП), облитерирующий бронхолит (нетрансплантационный) против NSIP, синдром Гийена — Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическая IgA-нефропатия, линейный IgA-дерматоз, острый фебрильный нейтрофильный дерматоз, субкорнеальный пустулезный дерматоз, транзиторный акантолитический дерматоз, цирроз, такой как первичный билиарный цирроз и пневмоцирроз, синдром аутоиммунной энтеропатии, целиакия или глютенная болезнь, целиакия спру (глютенная энтеропатия), рефрактерная спру, идиопатическая спру, криоглобулинемия, боковой амиотрофический склероз (ALS; болезнь Лу Герига), ишемическая болезнь сердца, аутоиммунное заболевание уха, такое как аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ), аутоиммунная потеря слуха, полихондрит, такой как рефрактерный или рецидивировавший или рецидивирующий полихондрит, легочный альвеолярный протеиноз, синдром Когана / несифилитический интерстициальный кератит, паралич Белла, болезнь/синдром Свита, аутоиммунная розацеа, боль, связанная с опоясывающим лишаем, амилоидоз, нераковый лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественная моноклональная гаммапатия и моноклональная гаммапатия неясного генеза, MGUS), периферическая нейропатия, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, периодический паралич и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительная миопатия, фокальный или сегментарный или фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), эндокринная офтальмопатия, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное гепатологическое заболевание, фибромиалгия, множественная эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аденолит, атрофия желудка, пресенильная деменция, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, синдром Дресслера, очаговая алопеция, тотальная алопеция, синдром CREST (кальциноз, феномен Рейно, нарушение

моторики пищевода, склеродактилия) и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие антисперматозоидных антител, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Шагаса, ревматическая лихорадка, привычный выкидыш, легкое фермера, мультиформная эритема, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, легкое птицевода, аллергический гранулематозный ангиит, доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, трансфузионная реакция, проказа, малярия, паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, кипаносомоз, шистосомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, муковисцидоз, эндофтальмит, стойкая возвышающаяся эритема, эритробластоз плода, эозинофильный фасцит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фуха, пурпура Геноха-Шенлейна, инфекция вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), SCK), синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), эховирусная инфекция, сепсис, эндотоксемия, панкреатит, тиреотоксикоз, парвовирусная инфекция, инфекция вирусом краснухи, поствакцинальные синдромы, врожденная краснушная инфекция, инфекция вирусом Эпштейна — Барр, свинка, синдром Эвана, аутоиммунная недостаточность половых желез, хорея Сиденгама, постстрептококковый нефрит, облитерирующий тромбангиит, тиреотоксикоз, спинная сухотка, хориоидит, гиганто-Т-клеточная полимиалгия, хронический гиперчувствительный пневмонит, сухой кератоконъюнктивит, эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический нефритический синдром, нефропатия с минимальными изменениями, доброкачественные семейные и ишемически-реперфузионные повреждения, реперфузия трансплантированного органа, аутоиммунная реакция в сетчатке, воспаление суставов, бронхит, хроническая

обструктивная болезнь дыхательных путей / легких, силикоз, афты, афтозный стоматит, атеросклеротические заболевания, аспермогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемия, контрактура Дюпюитрена, факоанафилактическая эндофтальмия, аллергический энтерит, узловатая проказная эритема, идиопатический паралич лицевого нерва, синдром хронической усталости, ревматический фебрил, болезнь Хаммана — Рича, сенсоневральная потеря слуха, пароксизмальная гемоглобинурия, гипогонадизм, региональный илеит, лейкопения, инфекционный мононуклеоз, поперечный миелит, первичная идиопатическая микседема, нефроз, симпатическая офтальмия, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервейна, приобретенная атрофия селезенки, незлокачественная тимома, витилиго, синдром токсического шока, пищевое отравление, состояния, сопровождающиеся инфильтрацией Т-клеток, нарушение адгезии лейкоцитов, иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, сопровождающиеся лейкоцитарным диapedезом, синдром полиорганного поражения, заболевания, опосредованные комплексами антиген-антитело, заболевание, связанное с антителами к базальной мембране почечных клубочков, аллергический неврит, аутоиммунные полиэндокринопатии, оофорит, первичная микседема, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическая офтальмия, ревматические заболевания, смешанное заболевание соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринная недостаточность, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, идиопатический гипопаратиреоз у взрослых (АОИ), кардиомиопатия, такая как дилатационная кардиомиопатия, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохроматоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит, решетчатый, лобный, верхнечелюстной или клиновидный синусит, расстройства, связанные с эозинофилами, такие как эозинофилия, легочная инфильтрационная эозинофилия, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Лоффлера, хроническая

эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия, бронхопневмонический аспергиллез, аспергиллома или гранулемы, содержащие эозинофилы, анафилаксия, серонегативные спондилоартриты, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склеровый, эписклеровый хронический кожно-слизистый кандидоз, синдром Брутона, транзиторная гипогаммаглобулинемия младенцев, синдром Вискотта — Олдрича, синдром атаксии-телеангиэктазии, ангиэктазия, аутоиммунные нарушения, связанные с коллагеновой болезнью, ревматизм, неврологическое заболевание, лимфаденит, снижение реакции артериального давления, сосудистая дисфункция, повреждение тканей, сердечно-сосудистая ишемия, гипералгезия, почечная ишемия, церебральная ишемия и заболевания, сопровождающие васкуляризацию, аллергические расстройства с гиперчувствительностью, гломерулонефриты, реперфузионное повреждение, ишемическо-реперфузионное повреждение, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, лимфоматозный трахеобронхит, воспалительные дерматозы, дерматозы с острым воспалительным компонентом, полиорганная недостаточность, буллезные заболевания, кортикальный некроз почек, острый гнойный менингит или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы, воспалительные заболевания глаз и глазниц, синдромы, связанные с переливанием гранулоцитов, цитокин-индуцированная токсичность, нарколепсия, острое серьезное воспаление, хроническое трудноизлечимое воспаление, пиелит, эндартериальная гиперплазия, пептическая язва, вальвулит и эндометриоз.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевания, связанные с трансплантацией, такие как реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD). Согласно одному варианту осуществления, GVHD представляет собой острую GVHD. Согласно другому варианту осуществления, GVHD представляет собой хроническую GVHD.

**[0095]** В другом варианте осуществления в настоящем описании предложен способ применения полинуклеотида для лечения заболевания или состояния, описанного



выше, причем полинуклеотид кодирует антитело к NKG2D, описанное в настоящем документе.

[0096] Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержат», «содержащий», «включает», «включающий», «имеющий» и их подобия означают «включая, без ограничений».

[0097] При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин «антитело» или «по меньшей мере одно антитело» может включать множество антител.

[0098] В настоящей заявке различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено исключительно для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение, накладываемое на сущность антител к NKG2D и варианты их применения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона включает все возможные конкретные поддиапазоны, а также отдельные численные значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, например от 1 до 6, следует рассматривать как описание конкретных поддиапазонов, например от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельных чисел в этом диапазоне, например 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это не зависит от широты диапазона.

[0099] При любом указании численного диапазона в настоящем документе подразумевается, что он включает любое упомянутое число (дробное или целое) в пределах указанного диапазона. Фразы «варьирует между» первым указанным числом и вторым указанным числом и «находится в диапазоне от» первого указанного числа «до» второго указанного числа используются в настоящем документе взаимозаменяемо и предназначены для включения первого и второго указанных чисел, а также всех дробных и целых чисел между ними.

[0100] Когда значения указаны как приблизительные с использованием предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение формирует другой вариант осуществления. Все диапазоны являются включающими и комбинируемыми. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению в пределах 0,1–5% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин «около» относится к отклонению в пределах 1–10% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до 20% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до  $\pm 10\%$  от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до  $\pm 5\%$  от указанного числа или диапазона чисел.

[0101] Все технические и/или научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области, к которой относятся антитела к NKG2D и варианты их применения. В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для проверки или анализа вариантов осуществления антител к NKG2D и вариантов их применения можно использовать способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны ниже. В случае конфликта преимущественную силу имеет описание патента, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения. Каждый литературный источник или другая цитата в настоящем документе включается в данный документ путем ссылки в полном объеме.

[0102] В описании, представленном в настоящем документе, описана каждая из стадий получения и использования антител к NKG2D и их вариаций. Это описание не подразумевает ограничений, и возможны изменения компонентов, последовательности стадий и другие вариации, которые следует понимать как входящие в объем настоящих антител к NKG2D и вариантов их применения.

[0103] Следует понимать, что определенные признаки антител к NKG2D и вариантов их применения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предложены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки антител к NKG2D и вариантов их применения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предложены отдельно, или в любой подходящей подкомбинации, или в любом другом подходящем описанном варианте осуществления антител к NKG2D и вариантов их применения. Определенные особенности, описанные в контексте различных вариантов реализации, не следует рассматривать как важные особенности этих вариантов реализации, если только вариант реализации не действует без этих элементов.

[0104] Различные варианты осуществления и аспекты настоящих антител к NKG2D и вариантов их применения, изложенные выше в настоящем документе и заявленные в разделе формулы изобретения ниже, получают экспериментальную поддержку в следующих примерах.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

#### Получение моноклонального антитела к NKG2D в мышинной гибридоме

[0105] *Цель:* получение моноклональных антител к NKG2D с использованием технологии мышинной гибридомы.

[0106] *Методы:* получение антител к NKG2D в мышинной гибридоме. Антитела к NKG2D были созданы путем иммунизации мышей Balb/c и SJL при помощи NKG2D-ECD-hFc (внеклеточный домен NKG2D, слитый с человеческим Fc). У животных брали кровь и проверяли на титр антител с помощью твердофазного ИФА (тестовый забор крови 1 и тестовый забор крови 2). Клетки селезенки от иммунизированных мышей с высоким титром выделяли и сливали с использованием стандартных

процедур слияния для создания гибридомы, продуцирующей специфические антитела. Супернатанты, содержащие антитела, продуцируемые пулами этих клеток, подвергали первичному скринингу с помощью твердофазного ИФА на реактивность к белку NKG2D-ECD, слитому с Fc человека (NKG2D-ECD-hFc) и вторичному скринингу с помощью FACS на реактивность к клеткам, сверхэкспрессирующим NKG2D. Для скрининга протестировали с помощью FACS большое количество супернатантов гибридом на целевую активность антител.

[0107] Сверхэкспрессирующие клетки-мишени помещали в 96-луночные круглодонные полистирольные планшеты и инкубировали с чистыми супернатантами культур гибридом. Затем клетки промывали, инкубировали с флуоресцентно-меченым вторичным антителом. В качестве отрицательного контроля для проверки супернатантов, чтобы подтвердить, что реактивное антитело специфически распознает белок-мишень, использовали трансфицированные нецелевым белком исходные клетки (и оказалось, что реакция отсутствует). Положительные пулы идентифицировали и клонировали путем предельного разведения. После 1–2 слияний, положительные клоны, продуцирующие специфические антитела, были идентифицированы и селектированы с помощью твердофазного ИФА и FACS.

[0108] *Результаты:* после иммунизации животных сыворотку тестировали на связывание с рекомбинантным человеческим белком NKG2D-ECD-Fc (внеклеточный домен NKG2D, слитый с Fc человека) с помощью твердофазного ИФА и FACS (**Фиг. 1**). Как показано на **Фиг. 1А**, тестовый забор крови (ТВ) 1 у животных Balb/c или SJL в различных разведениях показал положительный титр против человеческого NKG2D-ECD-Fc по данным твердофазного ИФА по сравнению с образцами предварительно взятой крови (РВ). На **Фиг. 1В** показаны последовательные разведения титра тестового забора крови 1 против NKG2D/Dap10 человека, сверхэкспрессируемого в клетках CHO, и против NKG2D/Dap10 яванского макака, сверхэкспрессируемого в клетках CHO, при отсутствии реактивности в

исходных клетках СНО. У мышей SJL наблюдался более сильный иммунный ответ по сравнению с мышами Balb/c при тестировании на связывание с клетками NKG2D/Dap10 СНО. После испытания тестового забора крови 2, показавшего сходные результаты (данные не показаны) для слияния отбирали животных SJL № 8748 и № 8749. Первичный скрининг проводили после электрослияния для идентификации с помощью твердофазного ИФА положительных клонов против рекомбинантного человеческого NKG2D-ECD-Fc, используя человеческий Fc в качестве отрицательного контроля. Вторичный скрининг проводили на клетках СНО, сверхэкспрессирующих NKG2D/Dap10 человека или NKG2D/Dap10 яванского макака, для идентификации перекрестно-реактивных клонов, при этом исходные клетки СНО служили отрицательным контролем. В первичном скрининге отбирали 103 клон для вторичного скрининга. Вторичный скрининг выявил клоны, которые дополнительно подвергали субклонированию, и, наконец, 18 клонов переводили в стадию экспрессии в объеме 200 мл и очистки белком А. На **Фиг. 2** показаны идентификаторы выбранных клонов.

**[0109]** *Обзор:* создание моноклональных гибридом мыши против белка NKG2D человека привело к получению 20 клонов, которые были идентифицированы после первичного и вторичного скрининга с помощью твердофазного ИФА и FACS как обеспечивающие специфическую связь с NKG2D человека и яванского макака. Эти клоны дополнительно экспрессировали, анализировали и давали характеристику эффективности связывания.

## **ПРИМЕР 2**

### **Характеризация связывания моноклональных антител из мышинной гибридомы к NKG2D человека**

**[0110]** *Цель:* экспрессировать, очистить и охарактеризовать моноклональные антитела мыши к NKG2D по связыванию.

[0111] *Методы: экспрессия и очистка клонов гибридомы.* Вкратце  $\sim 0,25\text{--}0,5 \times 10^7$  клеток сеяли в роллер-флакон, предварительно заполненный 100 мл среды для продукции антител (Hybridoma-SFM + 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (с низким содержанием IgG), и инкубировали в роллерном устройстве для культивирования при скорости 300 об/ч в течение 14–16 дней при 37 °C без CO<sub>2</sub>. После этого клеточную суспензию переносили в центрифужную бутылку объемом 350 мл и центрифугировали при 3220 g, 4 °C в течение 15 мин, а затем фильтровали с помощью фильтровальной капсулы 0,45 мкм для удаления клеток и клеточного дебриса. Затем супернатант культуры загружали в предварительно уравновешенную аффинную колонку с белком А для аффинной очистки. Антитело элюировали из колонки 5 CV (объемов колонки) элюирующего буфера (буфер 0,1 М цитрат натрия, pH 3,0) и нейтрализовали до конечного pH 7,0 основанием Trizma, а затем диализировали в 100-кратном объеме элюирования фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), pH 7,4, при 2–8 °C в течение ночи и стерилизовали фильтрованием через шприцевой фильтр 0,22 мкм в боксе биологической безопасности. Затем очищенное антитело аликвотировали и хранили при -20 °C или -80 °C до использования.

[0112] *Связывание с целевым белком по данным твердофазного ИФА.* Вкратце целевой белок NKG2D-ECD-Fc разводили в PBS до конечной концентрации 0,7 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °C. Планшеты блокировали 250 мкл 1%-го бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буферном растворе с твином (PBST) в течение 1 ч при 37 °C, четыре раза промывали PBST с использованием Biotek (Elx405). Для всех антител делали последовательные разведения и наносили разведенное антитело на планшет 100 мкл/лунка, инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, промывали PBST 4 раза. После добавления по 100 мкл/лунка антител к IgG мыши (Fab-специфических) с пероксидазой хрена (HRP) (SIGMA A3682) 1 : 10 000 клетки инкубировали в течение

0,5 ч при 37 °С. После 4-кратной промывки PBST добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCl для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм (прибор SpectraMax M5e). Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 5, используя нелинейную регрессию (аппроксимацию кривой) для зависимости log (агонист) против ответа, где агонист представляет собой концентрацию антитела (нМ), а ответ представляет собой значение оптической плотности (OD).

[0113] *Связывание с клетками по данным FACS.* Вкратце клетки суспензионной культуры собирали напрямую или прикрепленные клетки отщепляли ферментом TrypLE Express (кат. № 12604-013, поставщик Life technologies) перед сбором. Центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Клетки суспендировали в концентрации  $2 \times 10^6$ /мл в буфере для FACS (2% FBS в PBS) и наносили по 100 мкл/лунка клеточной суспензии на планшет (кат. № 3799, поставщик Corning). Планшеты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Затем клетки ресуспендировали 100 мкл/лунку антител набора Tribody (400 нМ исходная, 4-кратное разведение, 8 точек, включая точку 0), и планшет инкубировали в течение 60 мин при 4 °С. Планшеты центрифугировали при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Затем клетки промывали 3 раза по 170 мкл буфера для FACS, ресуспендировали при 100 мкл/лунка со вторичным антителом и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С в темноте. Планшеты центрифугировали при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Затем клетки промывали 3 раза буфером для FACS и анализировали с помощью FACS.

[0114] *Группировка по этитопам с помощью твердофазного ИФА.* Вкратце целевые антитела разводили в PBS до конечной концентрации 1 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик

Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °С. После блокирования с помощью 250 мкл 1% BSA в PBST в течение 1 ч при 37 °С добавляли последовательные концентрации биотинилированного антигена hNKG2D-ECD-Fc. Промывали планшет PBST 3 раза после инкубации в течение 1,5 ч при 37 °С, затем добавляли по 100 мкл стрептавидин-HRP (кат. S5512, поставщик Sigma, 1 : 10 000) на каждую лунку. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С промывали планшет PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCL для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм. Определяли значение ЕС80 антигена с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 5.

[0115] Ниже описана схема последовательных разведений мАт, которые смешивали с белком перед связыванием с планшетом, покрытым мАт. Разводили целевые антитела к NKG2D человека в PBS с конечной концентрацией 1 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °С. После блокирования 250 мкл 1% BSA в PBST в течение 1 ч при 37 °С добавляли смесь биотинилированного антигена в концентрации ЕС80 (2-кратный препарат, добавляли по 50 мкл) и конкурирующих антител (40–80-кратный препарат, добавляли по 50 мкл). Промывали планшет PBST 3 раза после инкубации в течение 1,5 ч при 37 °С, затем добавляли по 100 мкл стрептавидин-HRP (кат. S5512, поставщик Sigma, 1 : 10 000) на каждую лунку. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С промывали планшет PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCL для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм.



[0116] *Результаты:* на **Фиг. 3** показано связывание очищенных мАт с антигеном NKG2D-ECD-Fc по данным твердофазного ИФА. Исключая мАт019, среди этих антител наблюдали диапазон значений EC80 от 0,03 нМ до 0,6 нМ.

[0117] На **Фиг. 4** показано связывание по данным FACS выбранных очищенных мАт с клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 человека / яванского макака, а также с первичными НК-клетками, очищенными из МКПК здорового донора. Как показано на **Фиг. 4**, все очищенные мАт демонстрировали активность связывания с СНОК1-hNKG2D, СНОК1-cNKG2D и первичными НК-клетками с различным диапазоном аффинности и эффективности.

[0118] Наблюдали диапазон значений EC50 ~ 0,4–3,8 нМ для связывания с клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 человека (**Фиг. 4А**). Аналогично наблюдали диапазон значений EC50 ~ 0,7–8 нМ для связывания с клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D/Dap10 яванского макака (**Фиг. 4В**). Две концентрации, протестированные на связывание с первичными НК-клетками, показали дозозависимое связывание для всех мАт с различными MFI (**Фиг. 4С**). Связывания не наблюдали на исходных клетках СНО (данные не показаны).

[0119] На **Фиг. 5** показана сводка по анализу группировки по эпитопам, выполненному с помощью твердофазного ИФА. Анализ твердофазным ИФА указывает, что 4 группы, различавшиеся по группировкам эпитопов, таковы: группа 1 (квадрат, непрерывная линия) объединяет мАт001, 002, 003, 004, 005, 006, 008, 011, 013, 015, 017, 018, 020. Группа 2 (круг, непрерывная линия) объединяет мАт007, 010, 014. Группа 3 (квадрат, пунктирная линия) объединяет мАт012, 016, 019. Группа 4 (круг, пунктирная линия) объединяет мАт009. Антитело положительного контроля отличалось от всех групп.

[0120] *Обзор:* моноклональные антитела (мАт) к NKG2D человека были успешно сгенерированы с использованием технологии гибридомы. Были идентифицированы и охарактеризованы 20 клонов. Выбранные мАт дополнительно экспрессировали и продуцировали в гибридных клонах. мАт дополнительно очищали, анализировали

с помощью МС (масс-спектрометрии) и давали характеристику с помощью твердофазного ИФА на связывание с антигеном NKG2D-ECD-Fc, а также с помощью FACS на связывание с клетками, экспрессирующими NKG2D/Dap10 человека и яванского макака, и, наконец, тестировали на группировки эпитопов с помощью твердофазного ИФА, что дало 4 группы-корзины.

### ПРИМЕР 3

#### Функциональная оценка *in vitro* моноклональных антител из мышинной гибридомы

[0121] **Цель:** оценка *in vitro* активации NK-клеток при связывании мАт к NKG2D с первичными NK-клетками по повышению экспрессии CD107a и IFN $\gamma$ .

[0122] **Методы:** вкратце NK-клетки выделяли из МКПК от здорового донора с использованием набора для выделения NK-клеток человека EasySep™ Human NK Cell Isolation Kit (STEMCELL, кат. № 17955). Суспендировали NK-клетки в RPMI 1640 (Gibco, кат. № A10491-01), содержащей 10% FBS и 100 нг/мл hIL-2 (R&D SYSTEMS, кат. № 219-IL), в течение 2 дней. Прикрепляли антитела путем нанесения их на 96-луночный планшет (кат. № 3599, Corning) и затем инкубирования в течение ночи при 4 °C. Удаляли супернатант из планшета с покрытием и затем дважды промывали планшет 200 мкл PBS. Собирали стимулированные NK-клетки путем центрифугирования при 500 g в течение 5 мин, доводя концентрацию клеток до  $5 \times 10^5$ /мл средой для стимуляции NK-клеток (RPMI 1640 + 10%FBS + 20 нг/мл hIL-2), затем добавляли NK-клетки по 200 мкл/лунка на планшет с покрытием из антител. К NK-клеткам отдельно добавляли конъюгированные с APC антитела к CD107a (Biolegend, кат. № 328620) и контроль (0,5 мкл/тест) соответственно. Планшет инкубировали в атмосфере 5% CO $_2$  с увлажнением при 37 °C в течение 4 ч. Собирали супернатант для измерения IFN-гамма и клетки для измерения CD107a соответственно. Измерение CD107a: переносили клетки в планшет для FACS (кат. № 3799, Corning). Промывали клетки дважды 200 мкл буфера для FACS (2% FBS в

PBS). Добавляли конъюгированные с APC антитела к CD107a, конъюгированные с FITC антитела к CD3 (Invitrogen, кат. № 17-0037-41), и конъюгированные с BV421 антитела к CD56 (BioLegend, кат. № 318328), и контроль соответственно к суспензии NK-клеток и инкубировали клетки в течение 1 ч при 4 °C. После 2-кратной промывки 200 мкл буфера для FACS ресуспендировали клетки в 100 мкл холодного PBS. Клетки держали в темноте и отправляли на анализ FACS (FACS Canto II, BD Biosciences). Измерение IFN-гамма: IFN-гамма измеряли в соответствии с протоколом для набора Human INF gamma DuoSet ELISA kit (R&D, DY285). Вкратце захватывающее антитело наносили в рабочей концентрации в PBS на 96-луночный микропланшет (кат. № 9018, Corning) и инкубировали в течение ночи при комн. темп. После 3-кратной промывки планшеты блокировали 300 мкл разбавляющего реагента (1% BSA в PBS) в течение по меньшей мере 1 ч при комн. темп. После 3-кратной промывки добавляли 100 мкл образца с надлежащим разведением или стандарты в разбавляющем реагенте и инкубировали в течение 2 часов при комн. темп. После трехкратной промывки добавляли по 100 мкл разбавленного детектирующего антитела и инкубировали в течение 2 часов при комн. темп. После трехкратной промывки добавляли по 100 мкл рабочего разведения комплекса стрептавидин-HRP В и инкубировали в течение 20 мин при комн. темп. После трехкратной промывки добавляли 100 мкл раствора субстрата и инкубировали в течение 20 мин при комн. темп. Добавляли 50 мкл стоп-раствора. Считывали оптическую плотность при 450 нм (OD450) с помощью сканера для микропланшетов (Molecular Device, кат. № Spectra Max M5e).

[0123] *Результаты:* На Фиг. 6 показана активация NK-клеток при связывании с очищенными мАт к NKG2D (при 10 нМ или 100 нМ), определенная по накоплению маркера активации CD107a или по секреции IFN-гамма. Валидность анализа подтверждали по окну, определяемому с помощью антитела IM-1060 Tribody положительного контроля и антитела IM-1091 Tribody отрицательного контроля. Дозозависимое накопление NK-клеток CD107a<sup>+</sup> определяли по связыванию с мАт с

помощью FACS в сравнении с контрольным IgG мыши (Фиг. 6А). 10 из тестируемых мАт также стимулировали секрецию IFN-гамма, измеренную в супернатантах с помощью твердофазного ИФА (Фиг. 6В).

[0124] *Обзор:* Двадцать очищенных мАт к NKG2D характеризовали по связыванию и активации. Антитела ранжировали на основе их связывающей активности, а также их активности активации NK-клеток. Четыре мАт (мАт001, мАт009, мАт010 и мАт019), по одному из каждой корзины, подтверждали с помощью масс-спектрометрии (данные не показаны) и дополнительно отбирали на основе их продемонстрированных характеристик для введения в конструктор Tribody и оценки.

#### ПРИМЕР 4

##### Оценка *in vitro* блокирования взаимодействия NKG2D-MICA с помощью моноклональных антител из мышиных гибридом

[0125] *Цель:* оценка *in vitro* блокирующей активности очищенных мАт в отношении взаимодействия рецептор-лиганд для NKG2D-MICA.

[0126] *Методы:* анализ взаимодействия с рецептором с помощью конкурентного твердофазного ИФА: разводили целевой белок (NKG2D-ECD-hFc, партия: 20200413002, CP) в PBS до конечной концентрации 1 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °C. После блокирования 250 мкл 1% BSA в PBST в течение 1 ч при 37 °C добавляли смесь последовательных разведений мАт 1 : 5, начиная с 300 нМ (препарат 600 нМ, добавляли 50 мкл) и человеческого MICA-His в концентрации EC80 (2-кратный препарат, добавляли 50 мкл). После инкубации в течение 1,5 ч при 37 °C промывали планшет 3 раза PBST, затем добавляли 100 мкл анти-His-HRP (1 : 5000) в каждую лунку. После инкубации в течение 1 ч при 37 °C промывали планшет PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCl для завершения реакции. Планшеты считывали

с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм.

[0127] *Результаты:* мАт анализировали на их способность блокировать взаимодействие NKG2D-MICA. Как показано на **Фиг. 7**, диапазон степени ингибирования, показанной в виде значений IC50, составил 1,4нМ – 8нМ, при этом ингибирование не наблюдалось у отрицательного контроля mIgG1.

[0128] *Вывод:* все протестированные мАт проявляли блокирующую активность в отношении лиганд-рецепторного взаимодействия NKG2A-MICA.

## ПРИМЕР 5

### Рекомбинантная продукция химерного антитела Tribody из антитела к NKG2D человека, полученного из клонов гибридомы мыши против NKG2D человека

[0129] *Цель:* внедрить последовательности CDR мыши из выбранных антител к NKG2D человека (мАт001, мАт009, мАт010 и мАт019) в конструкторы Tribody/ProTribody, чтобы получить триспецифическое химерное антитело, которое содержит Fab к CD3, одну цепь мАт к NKG2D и одну цепь антитела к 5Т4, как показано на **Фиг. 8А–В** соответственно и ранее описано в публикации WO2020/225805, полностью включенной в настоящий документ.

[0130] *Методы:* секвенирование гибридомы. Вкратце выбранные положительные моноклональные гибридомные клетки ( $\sim 1 \times 10^7$ ) собирали для выделения общей РНК в соответствии с протоколом для реагента NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, 740404.200). Общую РНК использовали для синтеза кДНК в соответствии с руководством к набору SMARTer® RACE 5'/3' и использовали случайный праймер для синтеза кДНК первой цепи. Для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепей методом ПЦР использовали синтетическую кДНК в качестве матрицы и праймеры из набора Ig-Primer Set (Novagen, 69831-3) в качестве ген-

специфического праймера (GSP). Собирали продукты ПЦР нужного размера, очищали с помощью реактивов NucleoSpin® Gel и PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250) в соответствии с руководством набора и подвергали ТА-клонированию и секвенированию. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей (VH и VL) мАт к NKG2D клонировали в конструкции Tribody, как описано ниже, которые затем характеризовали по связыванию с NKG2D с помощью твердофазного ИФА и FACS.

**[0131]** *Синтез генов и конструирование плазмиды.* Кодированные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) триспецифического антитела получали путем синтеза ДНК и методом ПЦР, затем субклонировали в плазмиду на основе pCDNA3.4 (Invitrogen) для экспрессии белка в системе клеток млекопитающего. Наконец генные последовательности в экспрессионных векторах подтверждали секвенированием ДНК.

**[0132]** *Экспрессия триспецифического антительного конструкта.* Временную экспрессию антител Tribody/Pro-Tribody проводили путем котрансфекции парных конструкций HC и LC (соотношение HC/LC 1 : 1 для формата Tribody или отношение HC/LC 2,5 : 1 для формата ProTribody) в клетки CHO с использованием полиэтиленимидного метода (PEI). Вкратце 1 л клеток CHO в концентрации приблизительно  $5,5 \times 10^6$ /мл в 3-литровой колбе для встряхивания использовали в качестве клеток-хозяев. Трансфекцию инициировали добавлением смеси 1 мг общей ДНК и 4 мг PEI в 100 мл среды OptiMEM (Invitrogen) к клеткам и осторожным перемешиванием. Затем клетки культивировали в инкубаторе-шейкере при 120 об/мин, 37 °C и 8% CO<sub>2</sub> в течение 8–10 дней. Подкармливание пептоном и глюкозой проводили через 24 ч и каждые 2–3 дня в зависимости от плотности и жизнеспособности клеток. Культивирование клеток прекращали на 8–10-й день, когда жизнеспособность клеток снижалась до < 80%. Кондиционированную среду собирали для очистки белка.

**[0133]** *Очистка триспецифического антительного конструкта.* Очистку белка путем аффинной хроматографии и ЭХР проводили с использованием прибора АКТА

pure (GE Lifesciences). Аффинный захват антитела Tribody был достигнут путем пропускания собранных супернатантов через колонку CaptureSelect™ CH1-XL Affinity Matrix (Thermo Scientific). После промывки колонки буфером А (25 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, pH 7,5) белок элюировали буфером В (50 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, pH 3,0) и немедленно нейтрализовали 1/6 объема колонки буфера D (1 М аргинина, 400 мМ янтарной кислоты, pH 9,0). Аффинно очищенный белок затем концентрировали до 5–10 мг/мл с использованием концентратора Amicon 30kD (Merck Millipore) и подвергали очистке ЭХР на колонке Superdex200 (GE Lifesciences), уравновешенной буфером для ЭХР: 200 мМ аргинина, 137 мМ янтарной кислоты, 0,05% Tween-80, 150 мМ NaCl, pH 5,0. Собирали целевые фракции Tribody, затем добавляли 5% трегалозы (146 мМ). Целевые антитела Tribody анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и ВЭЖХ-ЭХР.

**[0134]** *Анализ триспецифического антительного конструкта с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.* Анализ антитела Tribody методом ДСН-ПААГ-электрофореза проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в предварительно отлитых полиакриламидных гелях. Вкратце 2 мкг образцов Tribody смешивали с буфером для образцов NuPAGE™ LDS (ThermoFisher NP0008) с добавлением 70 мМ ДТТ или без него. После инкубации при 25 °С или 90 °С в течение 10 мин образцы и неокрашенные стандарты белка (BIO RAD-161–0363) загружали на гели. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 120 В с подвижным буфером 1 × Tris-глицин-ДСН. После электрофореза гели окрашивали в течение ночи с использованием Кумасси синего и убирали краситель раствором для обесцвечивания (10% уксусной кислоты, 40% метанола и 50% воды). Обесцвеченные гели сканировали с помощью системы визуализации гелей (Tanon-2500R).

**[0135]** *Анализ триспецифического антительного конструкта методом ЭХР-ВЭЖХ.* Аналитические ЭХР-ВЭЖХ проводили с использованием прибора Shimadzu LC-10 HPLC (Shimadzu Corp.). 20 мкл образца при 1 мг/мл загружат на колонку

Superdex 200 Increase 5/150GL (GE Lifesciences). Подвижная фаза представляла собой 2 \* PBS со скоростью потока 0,3 мл/мин, 15 мин.

[0136] *ЖХ-МС анализ конструкта Tribody*. Tribody отделяли на ЭХР-колонке ACQUITY UPLC BEH200 Å, SEC (Waters 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм) при комнатной температуре и детектировали с помощью ИЭР-МС (Thermo, MS-B20-03). Подвижная фаза представляла собой раствор 0,1% муравьиная кислота : ацетонитрил (75 : 25, об./об.) со скоростью потока 0,2 мл/мин. Масс-спектрометрию проводили по положительному иону. Другие параметры масс-спектрометрии были такими: разрешение 17500, диапазон сканирования 1000–5000 m/z, CID в источнике 60 эВ, скорость потока защитного газа 30 л/мин, температура капилляра 350 °С, напряжение распыления 2,5 кВ.

[0137] *Результаты*: Были разработаны восемь конструктов Tribody, которые представляют два варианта каждого выбранного клона мАт (мАт001 представлено в IM-1244/5, мАт009 представлено в IM-1246/7, мАт010 представлено в IM-1248/9 и мАт019, представлено в IM-1250/1), для получения триспецифических химерных антител, которые содержат Fab к CD3, одну цепь антитела к NKG2D и одну цепь антитела к 5T4, как показано на **Фиг. 8** либо без регуляторных доменов (**Фиг. 8А**), либо с ними (**Фиг. 8В**). На **Фиг. 8С** показаны идентификаторы полученных мАт, где L-H указывает, что переменная область легкой цепи к NKG2D слита перед переменной областью тяжелой цепи к NKG2D, а H-L указывает, что переменная область легкой цепи к NKG2D слита после переменной области тяжелой цепи к NKG2D. Экспрессированные антительные конструкты HC и LC каждой из молекул Tribody ассоциируются с образованием единой молекулы, которую показывает одна широкая полоса ~ 100 кДа, наблюдаемая в ДСН-ПААГ-электрофорезе в невозстанавливающих условиях (NR), и двойная полоса на ~ 50 кДа в восстанавливающих условиях (R) (**Фиг. 9**). На **Фиг. 9** показан анализ методом ДСН-ПААГ-электрофореза антител IM-1244-IM1251 соответственно, где левая дорожка представляет собой маркер кДа (M), средняя дорожка представляет



восстанавливающие условия (R), а правая дорожка представляет собой невосстанавливающие условия (NR). На Фиг. 10А–Н показан анализ методом ЭХР-ВЭЖХ антител IM-1244-IM1251 соответственно и продемонстрирован один пик при времени удержания ~ 6 мин, что соответствует ожидаемому времени удержания для Mw на основе кривой калибровки массы.

[0138] *Вывод:* варианты триспецифического антитела Tribody успешно экспрессировали и очищали.

### ПРИМЕР 6

#### Связывание антительных конструкторов Tribody с рекомбинантным белком NKG2D

[0139] *Цель:* исследовать эффективность связывания различных антительных конструкторов Tribody, которые состоят из домена ScFv против 5T4, домена Fab против CD3ε и антитела к NKG2D человека, полученного из клонов мышинной гибридомы, с рекомбинантным белком NKG2D методом твердофазного ИФА и с клетками, экспрессирующими мембранный белок NKG2D, методом FACS. Различные форматы могут состоять из маскирующих последовательностей CAP, расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, а также точно-мутированных связывающихся последовательностей, которые не обладают активностью связывания с конкретным связываемым агентом, и служат отрицательными контролями для форматов Tribody/Protribody.

[0140] *Методы:* измерение связывания с помощью твердофазного ИФА и FACS антительных конструкторов Tribody с антигенами или клетками, как описано в примере 2 выше.

[0141] *Результаты:* на Фиг. 11 показан анализ экспрессируемых триспецифических конструкторов на связывание с белком NKG2D-ECD-Fc по данным твердофазного ИФА. Значение EC50 для связывания с белком NKG2D-ECD-Fc

составляло 2,6 нМ для IM-1244 (малые круги), 1,1 нМ для IM-1245 (малые квадраты), 1,7 нМ для IM-1248 (малые ромбы), 0,7 нМ для IM-1249 (большие круги), при этом, как и ожидалось, не наблюдалось связывания для мутантного варианта антитела IM-1091 Tribody отрицательного контроля с NKG2D (большой ромб) (Фиг. 11).

[0142] На Фиг. 12 показан анализ экспрессированных триспецифических конструкторов на связывание с клетками, экспрессирующими белок NKG2D по данным FACS. Значение EC50 для связывания с клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D человека, составляло 8,6, 7, 12, 2,5, 4,9, 4,7 нМ для IM-1244 (малый круг), IM-1245 (малый квадрат), IM-1246 (малый треугольник, направленный вверх), IM-1247 (малый треугольник, направленный вниз), IM-1248 (малый ромб), IM-1249 (большой круг) и IM-1250 (большой квадрат) соответственно (Фиг. 12А). Значение EC50 для связывания с клетками СНО, сверхэкспрессирующими NKG2D яванского макака, составляло 21, 13, 15, 30, 5,9, 5,3 и 2,3 нМ для IM-1244 (малый круг), IM-1245 (малый квадрат), IM-1246 (малый треугольник, направленный вверх), IM-1247 (малый треугольник, направленный вниз), IM-1248 (малый ромб), IM-1249 (большой круг) и IM-1250 (большой квадрат) соответственно (Фиг. 12В). Значение EC50 для IM-1251 (большой треугольник, направленный вверх) было неприменимым, при этом не наблюдалось связывания для мутантного варианта антитела IM-1091 Tribody отрицательного контроля к NKG2D (большой ромб), как и ожидалось. В качестве антитела Tribody положительного контроля использовали IM-1060 (большой треугольник, направленный вниз). Связывание с исходными клетками СНО было неопределимым (данные не показаны).

[0143] **Вывод:** мышинные переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, секвенированные из выбранных клонов гибридомы, были идентифицированы и преобразованы в scFv и введены в конструкторы Tribody с образованием химерных молекул TriBody. Эти молекулы экспрессировали, очищали, дополнительно

характеризовали с помощью анализов связывания и продемонстрировали, что характеристики связывания с NKG2D человека сохраняются.

[0144] Как показано на **Фиг. 11**, химерное антитело Tribody, состоящее из антитела к NKG2D внутри формата TriBody, сохраняло связывание с белком NKG2D. Аналогично, как показано на **Фиг. 12**, связывание также было подтверждено на клетках, сверхэкспрессирующих NKG2D человека и яванского макака на клеточной поверхности. Tribody IM-1245, IM-1246, IM-1249 и IM-1250, которые представляют МАТ001, МАТ009, МАТ010 и МАТ019 соответственно, были дополнительно выбраны для анализа функциональной активности *in vitro*.

## ПРИМЕР 7

### Функциональная оценка *in vitro* антительных конструкторов Tribody

[0145] **Цель:** оценка *in vitro* дозозависимой активации НК-клеток вариантами Tribody на первичных МКПК от здорового донора в присутствии раковых клеток.

[0146] **Методы:** активация НК-клеток в присутствии клеток-мишеней. Суспендировали клетки МКПК в RPMI1640 (Gibco, кат. № A10491-01), содержащей 10% FBS и 100 нг/мл hIL-2 (R&D SYSTEMS, кат. № 219-IL), в течение 2 дней. После стимуляции собирали МКПК и клетки-мишени NCI-H226 путем центрифугирования при 500 g в течение 5 мин, доводили концентрацию клеток до  $4 \times 10^6$ /мл и  $2 \times 10^5$ /мл соответственно аналитическим буфером (RPMI 1640 + 5%FBS + 10 нг/мл hIL-2), а затем добавляли 50 мкл суспензии МКПК и 50 мкл суспензии NCI-H226 соответственно в 96-луночный планшет с круглым дном в соотношении E : T 20 : 1. Готовили разбавленные антитела (2\*) в аналитическом буфере, добавляли по 100 мкл/лунка, перемешивали в достаточной степени. К образцам отдельно добавляли конъюгированные с APC антитела к CD107a (Biolegend, кат. № 328620) и контроль (0,5 мкл/тест) по отдельности. Инкубировали планшет в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> с увлажнением при 37 °C в течение 4 ч. После инкубации центрифугировали планшет при 250 g в течение 4 мин при 4 °C, отбрасывали супернатант и переносили

все клетки на планшет для FACS с использованием буфера для FACS (PBS + 2% FBS). После двукратной промывки буфером для FACS добавляли конъюгированное с FITC антитело к CD3, конъюгированное с BV421 антитело к CD56 и конъюгированное с APC антитело к CD107a в 100 мкл буфера для FACS, инкубировали планшет при 4 °C в течение 45 мин в темноте. После двукратной промывки буфером для FACS ресуспендировали клетки в 100 мкл холодного PBS. Клетки направляли на многоцветный анализ FACS.

**[0147] Результаты:** Наблюдали 60–70%-ю активацию, измеренную по MFI CD107a на гейтированной по CD56<sup>+</sup> популяции NK-клеток, после совместного культивирования МКПК, полученных от здорового донора, и клеток-мишеней NCI-H226, экспрессирующих белок 5T4, в присутствии различных Tribody (IM-1245, IM-1246, IM-1249, IM-1250) при 300 нМ, 60 нМ, 12 нМ и 2,4 нМ (слева направо), и 30%-ю базальную активацию в отсутствие Tribody. Более низкая активация 35–40% наблюдалась в случае мутантного варианта антитела IM-1091 Tribody отрицательного контроля к NKG2D, который не имел связывания с NKG2D. Антитело IM-1060 Tribody служило в качестве положительного контроля (**Фиг. 13**).

**[0148] Вывод:** Было показано, что четыре выбранных Tribody, состоящие из последовательностей клонов мАт мыши к NKG2D человека из четырех группировок-корзин, активируют NK-клетки *in vitro*.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенное антитело к NKG2D, содержащее три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18; или

(ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26; или

(iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34; или

(iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

2. Антитело к NKG2D по п. 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем указанные вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39.

3. Антитело к NKG2D по п. 1 или 2, представляющее собой IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, минитело, диатело, триатело, нанотело, биспецифическое антитело или однодоменное антитело.

4. Антитело к NKG2D по п. 3, причем указанный IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Композиция, содержащая антитело к NKG2D по любому из пп. 1–4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Композиция по п. 5, причем антитело к NKG2D содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18; или

(ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26; или

(iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34; или

(iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

7. Композиция по п. 6, причем антитело к NKG2D содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом указанные переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39.

8. Выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к NKG2D по п. 1 или 2.

9. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 8.

10. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 9.

11. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к NKG2D по

любому из пп. 1–4.

12. Способ по п. 11, в котором заболевание представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или заболевание, связанное с NKG2D.

13. Способ по п. 11, в котором антитело к NKG2D содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

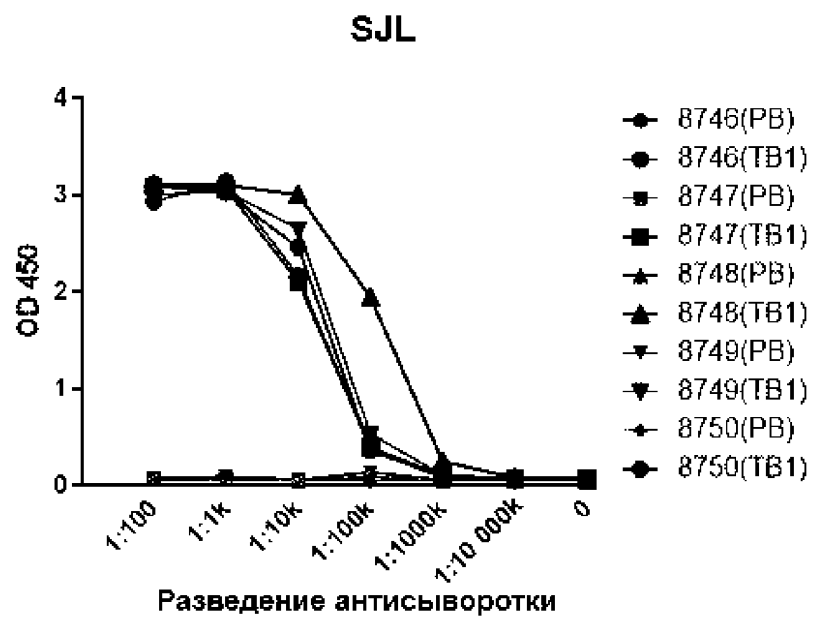
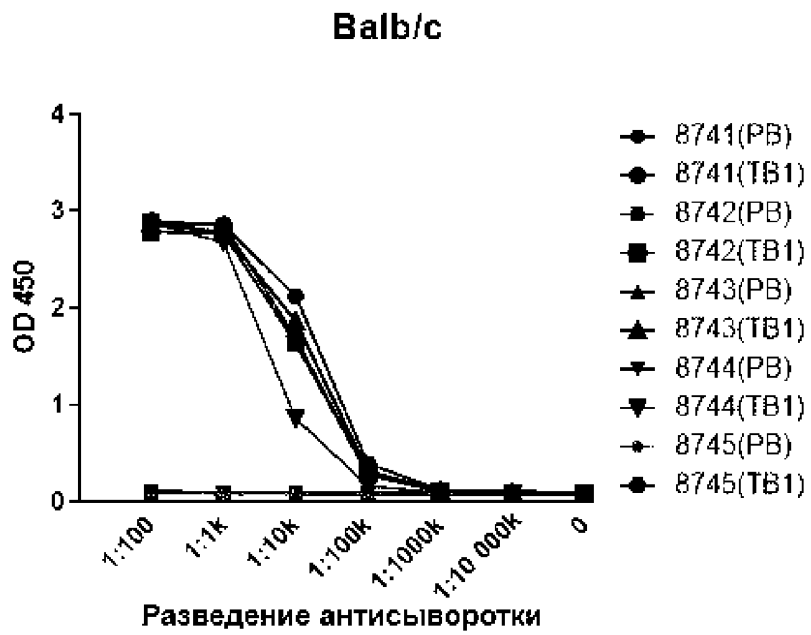
(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12–14, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 16–18; или

(ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20–22, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 24–26; или

(iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 28–30, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32–34; или

(iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 36–38, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 40–42.

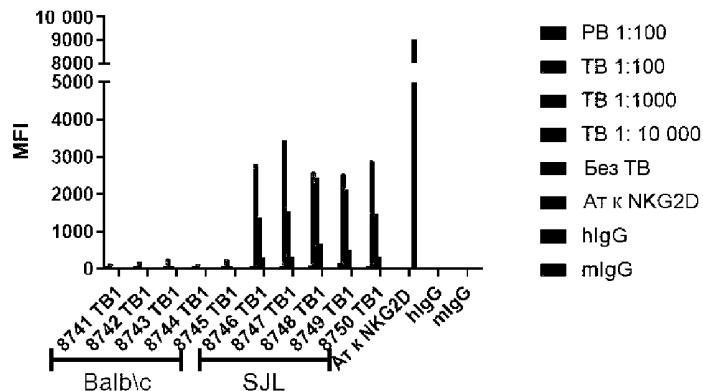
14. Способ по п. 13, в котором антитело к NKG2D содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем указанные переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 15; SEQ ID NO: 19 и 23; SEQ ID NO: 27 и 31; или SEQ ID NO: 35 и 39.



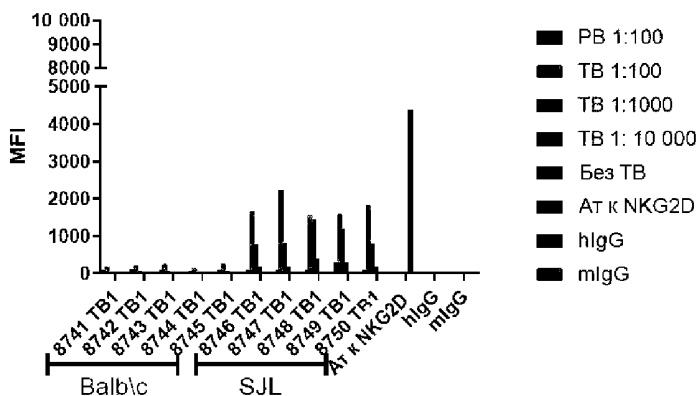
Фиг. 1А



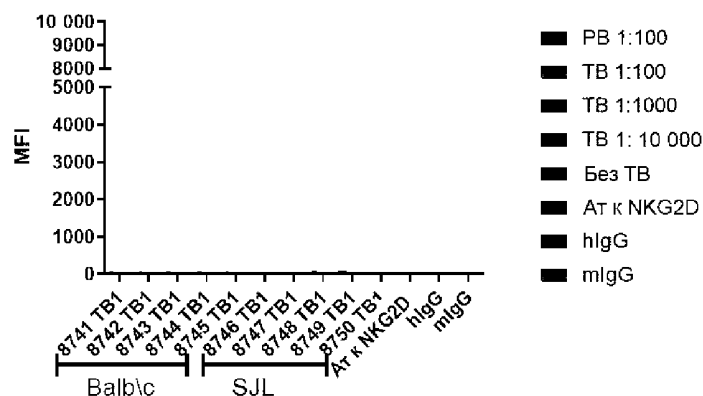
Клеточная линия CHOK1\hNKG2D\hDAP10



Клеточная линия CHOK1\cNKG2D\cDAP10



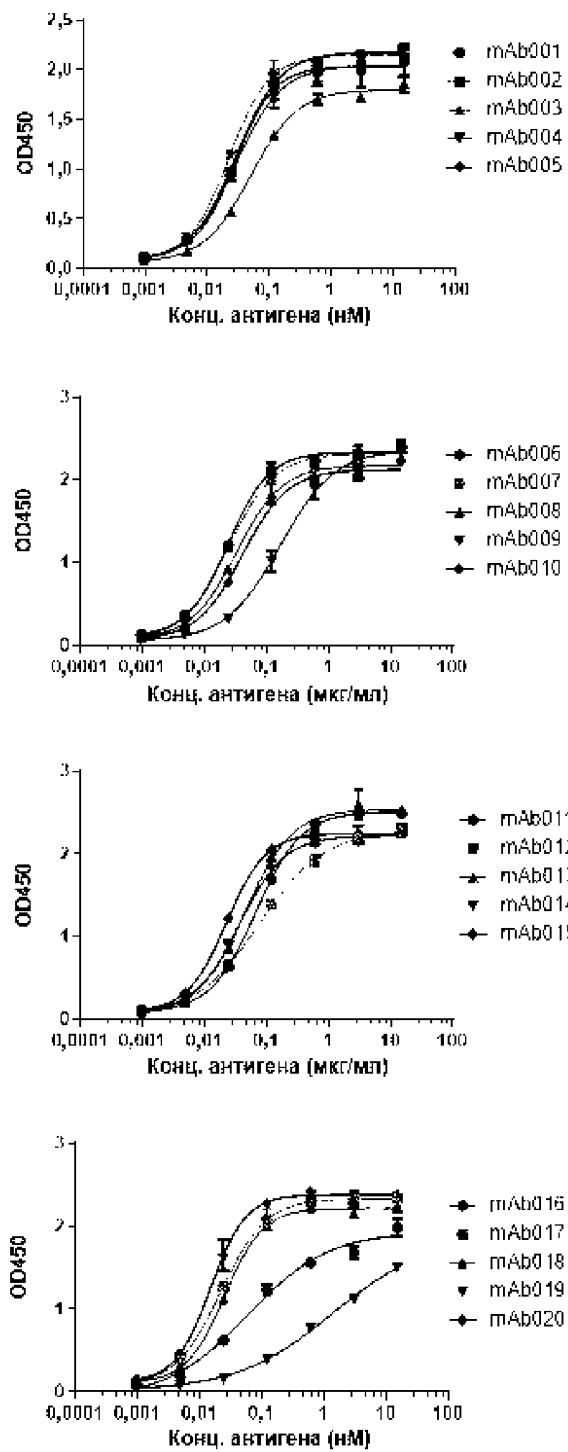
CHOK1\исходная клеточная линия



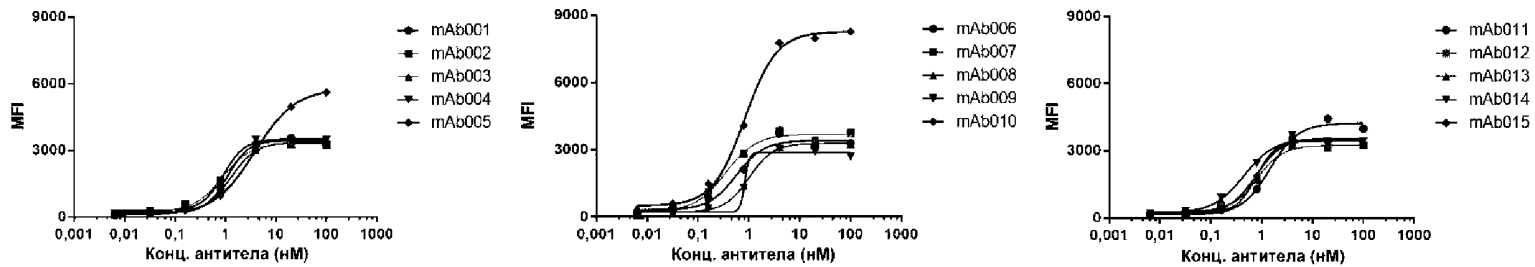
Фиг. 1B

<b>мАг №</b>	<b>идентификатор клона</b>
<b>1</b>	<b>19D4C6</b>
<b>2</b>	<b>20F11F1</b>
<b>3</b>	<b>22B3E3</b>
<b>4</b>	<b>26G9D9</b>
<b>5</b>	<b>38E1D12</b>
<b>6</b>	<b>3H8D8</b>
<b>7</b>	<b>6D11G9</b>
<b>8</b>	<b>9E8B12</b>
<b>9</b>	<b>19C12E8</b>
<b>10</b>	<b>19G2F5</b>
<b>11</b>	<b>20D5F4</b>
<b>12</b>	<b>38H4H8</b>
<b>13</b>	<b>13G5G9</b>
<b>14</b>	<b>25E2F4</b>
<b>15</b>	<b>1H4H8</b>
<b>16</b>	<b>17A2E2</b>
<b>17</b>	<b>33F10D6A9</b>
<b>18</b>	<b>4C12A11</b>
<b>19</b>	<b>31H4C2</b>
<b>20</b>	<b>20B4F3</b>

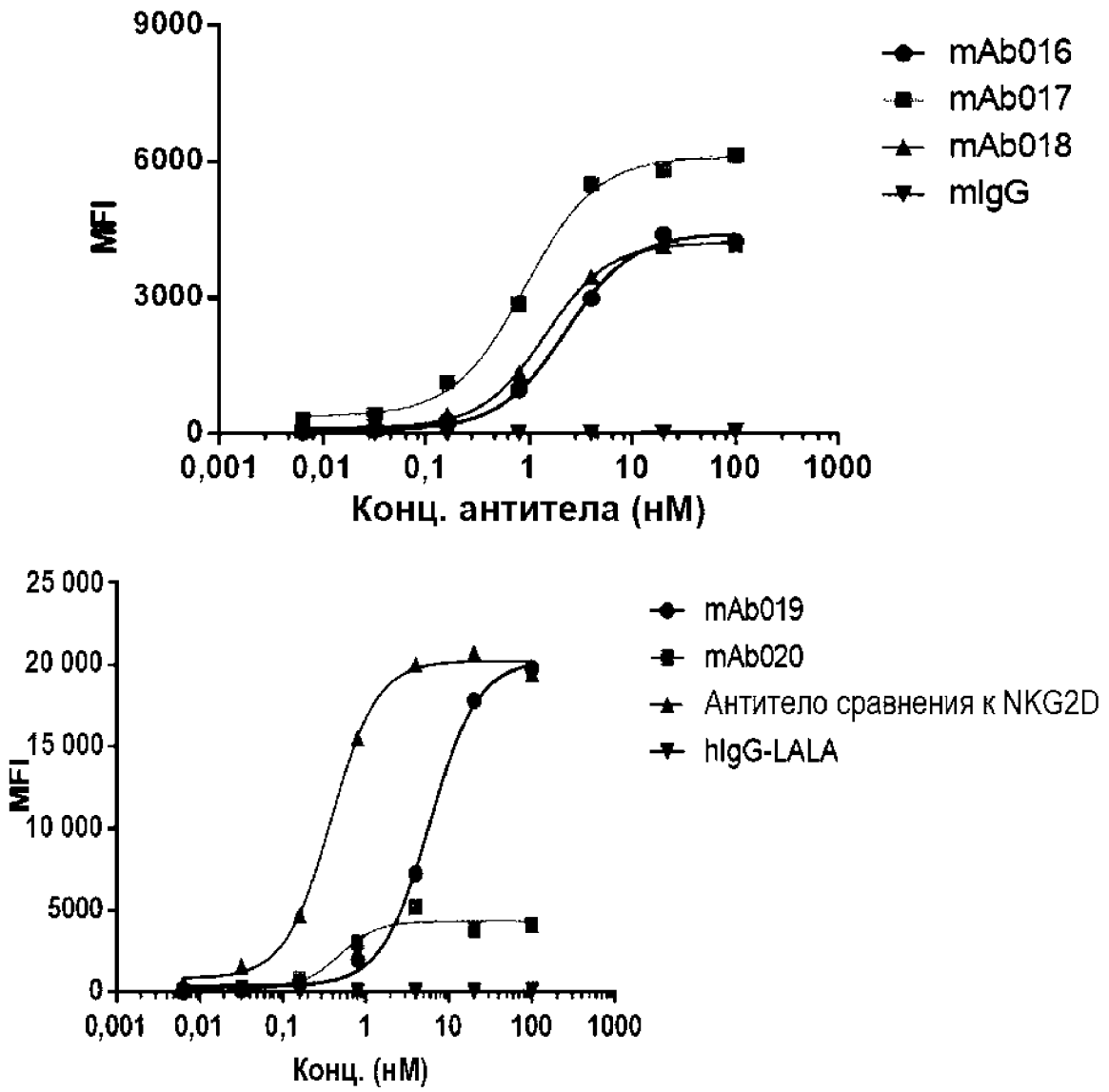
Фиг. 2



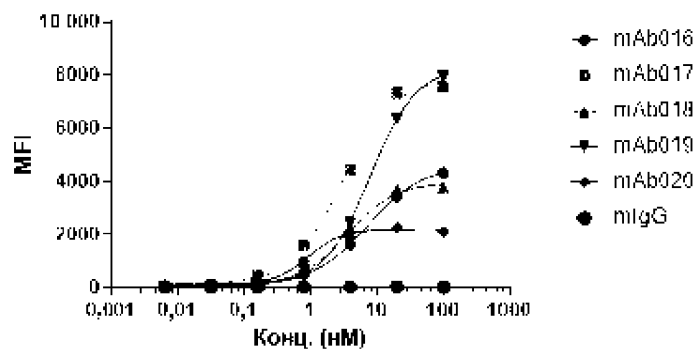
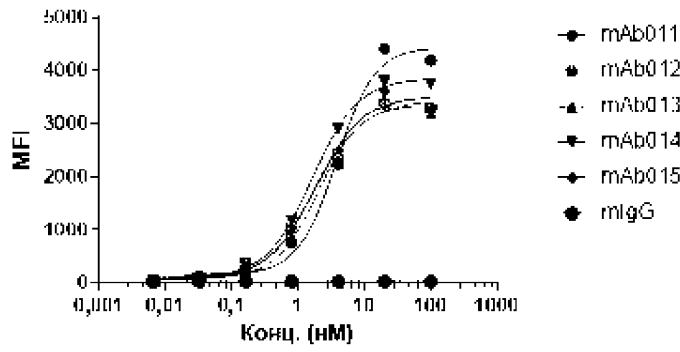
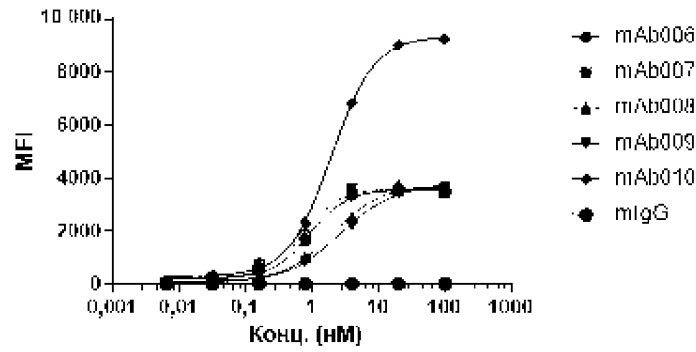
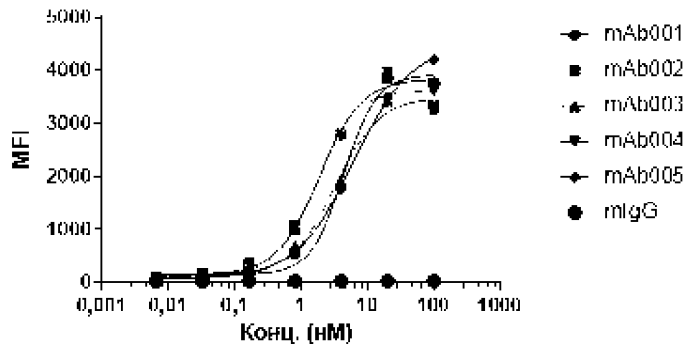
Фиг. 3



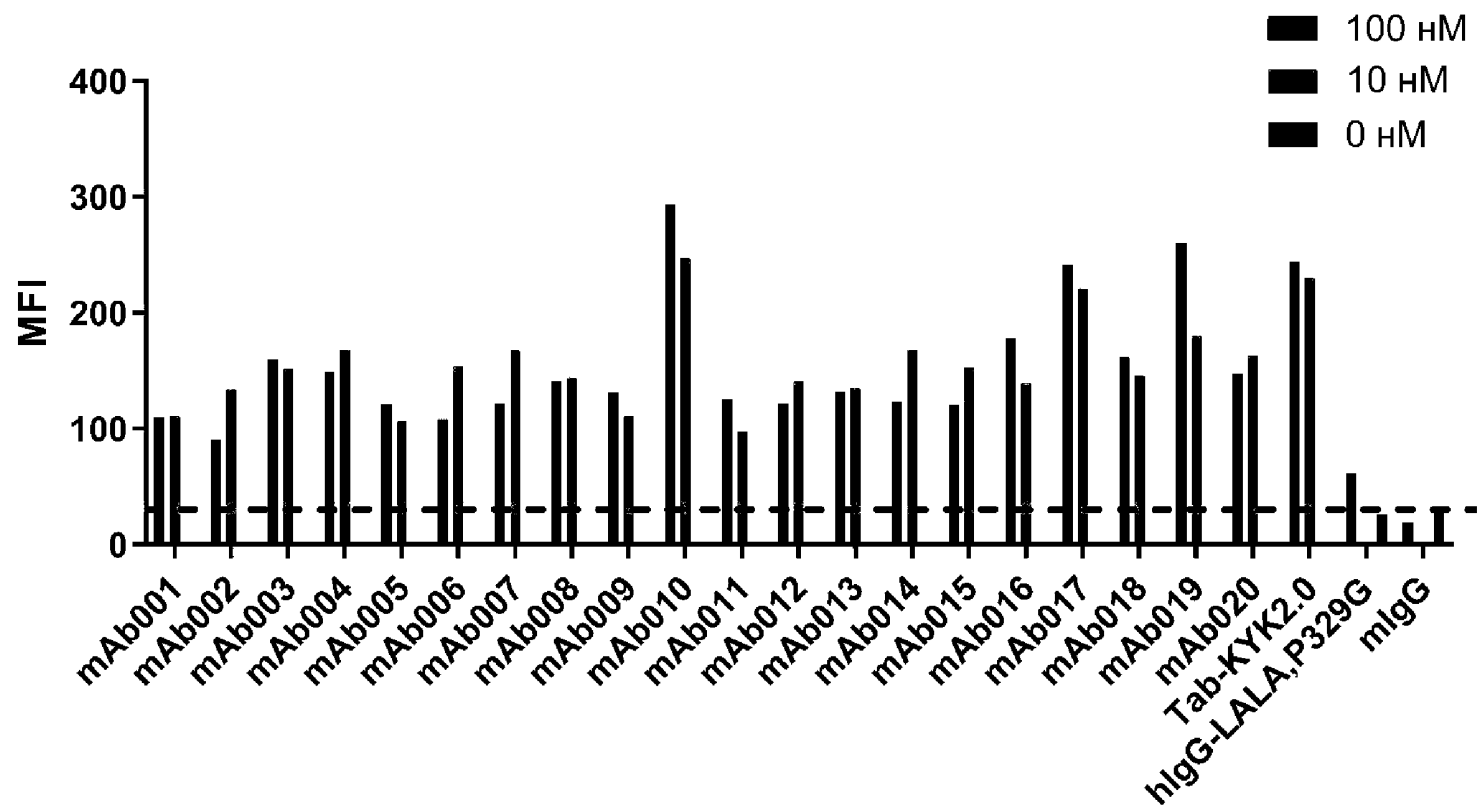
Фиг. 4А



Фиг. 4А (продолжение)



ФИГ. 4В

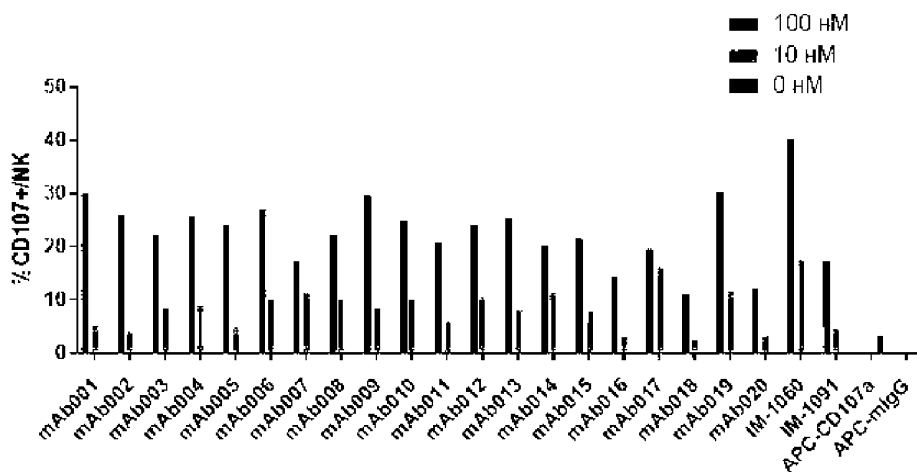


Фиг. 4С

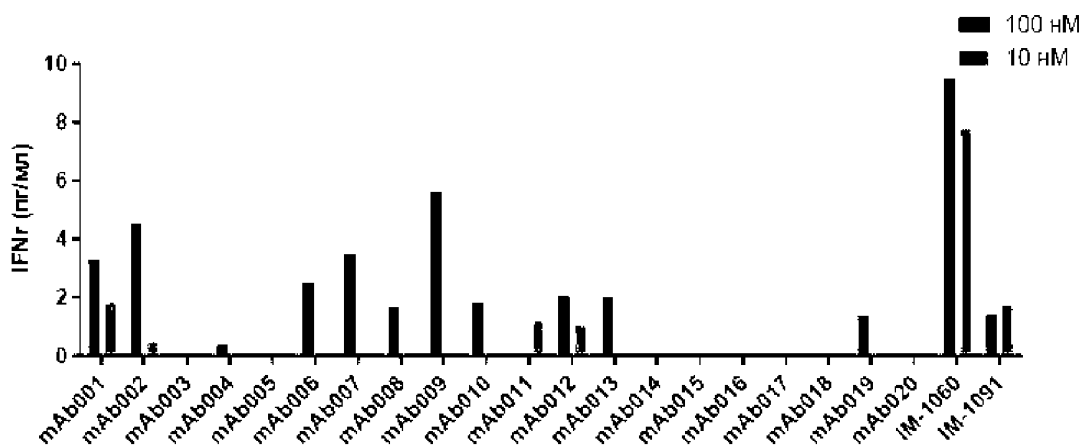
	mAb001	mAb002	mAb003	mAb004	mAb011	mAb013	mAb015	mAb017	mAb018	mAb020	mAb006	mAb008	mAb005	mAb009	mAb019	mAb012	mAb016	mAb007	mAb010	mAb014	KYK2.0
mAb001	88%	84%	91%	89%	84%	90%	87%	87%	82%	86%	78%	66%	68%	73%	56%	17%	44%	58%	71%	77%	93%
mAb002	93%	91%	93%	92%	91%	92%	91%	92%	88%	91%	87%	76%	72%	82%	58%	29%	32%	60%	69%	75%	94%
mAb003	91%	90%	94%	92%	90%	93%	91%	90%	88%	91%	84%	73%	71%	82%	54%	30%	34%	61%	72%	77%	94%
mAb004	93%	91%	95%	93%	90%	94%	92%	92%	89%	91%	86%	70%	70%	86%	56%	25%	34%	65%	72%	78%	95%
mAb011	97%	82%	92%	88%	91%	93%	87%	89%	88%	89%	79%	81%	79%	86%	65%	56%	56%	57%	71%	80%	92%
mAb013	97%	77%	93%	88%	91%	93%	88%	89%	89%	89%	81%	79%	70%	87%	64%	43%	47%	54%	69%	76%	94%
mAb015	97%	87%	94%	93%	91%	94%	92%	93%	90%	93%	88%	78%	70%	87%	63%	42%	36%	59%	71%	77%	95%
mAb017	97%	90%	95%	94%	92%	94%	93%	92%	92%	94%	90%	77%	69%	89%	65%	39%	43%	61%	73%	78%	95%
mAb018	97%	87%	94%	93%	93%	95%	93%	93%	92%	93%	89%	84%	74%	90%	72%	49%	64%	73%	84%	88%	95%
mAb020	97%	92%	95%	95%	92%	93%	93%	94%	93%	95%	90%	77%	66%	89%	69%	42%	48%	65%	76%	77%	95%
mAb006	94%	93%	95%	93%	92%	94%	94%	93%	91%	93%	89%	78%	78%	86%	64%	39%	50%	65%	75%	79%	94%
mAb008	87%	86%	93%	90%	94%	94%	89%	90%	89%	86%	79%	92%	91%	88%	74%	74%	76%	68%	83%	84%	95%
mAb005	88%	87%	93%	90%	93%	94%	89%	89%	89%	86%	77%	89%	89%	86%	70%	61%	60%	70%	82%	86%	94%
	73%	59%	80%	67%	75%	80%	64%	67%	67%	61%	45%	51%	58%	64%	52%	21%	32%	30%	48%	59%	92%
mAb019	87%	83%	92%	86%	93%	93%	85%	86%	86%	83%	69%	85%	87%	86%	72%	59%	69%	50%	70%	77%	94%
mAb012	92%	88%	93%	91%	94%	94%	90%	91%	92%	88%	81%	92%	93%	87%	73%	77%	75%	67%	84%	87%	95%
mAb016	93%	90%	94%	93%	95%	95%	91%	92%	92%	91%	87%	92%	93%	89%	74%	82%	74%	75%	86%	89%	94%
mAb007	37%	34%	83%	63%	31%	40%	32%	33%	28%	35%	22%	13%	15%	12%	-57%	4%	-20%	95%	95%	96%	95%
mAb010	34%	23%	49%	28%	93%	31%	29%	33%	21%	34%	23%	10%	9%	5%	-53%	2%	-11%	93%	95%	95%	94%
mAb014	97%	9%	56%	29%	13%	36%	22%	27%	19%	29%	20%	3%	-3%	6%	-53%	6%	-31%	89%	94%	95%	95%
KYK2.0	17%	8%	10%	17%	11%	17%	6%	9%	8%	15%	13%	6%	9%	-6%	-25%	-11%	-28%	13%	29%	41%	90%

Фиг. 5

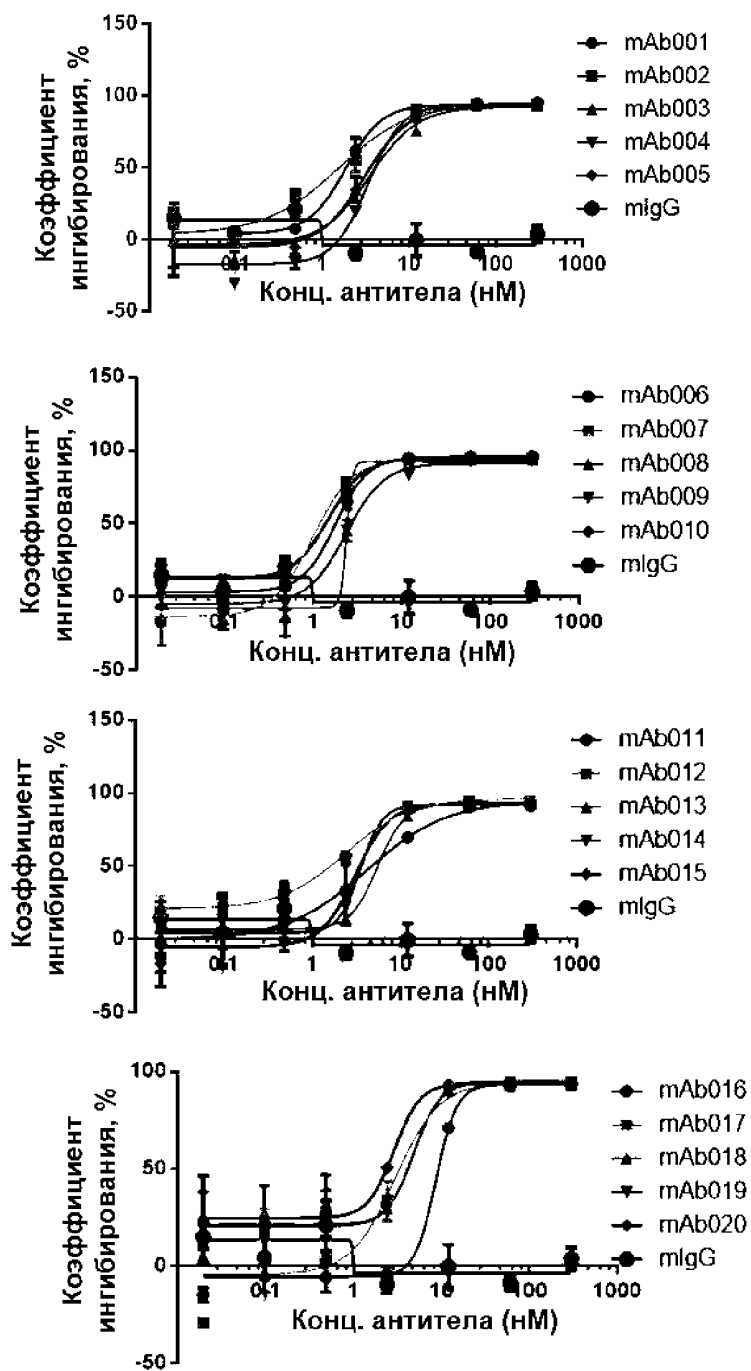




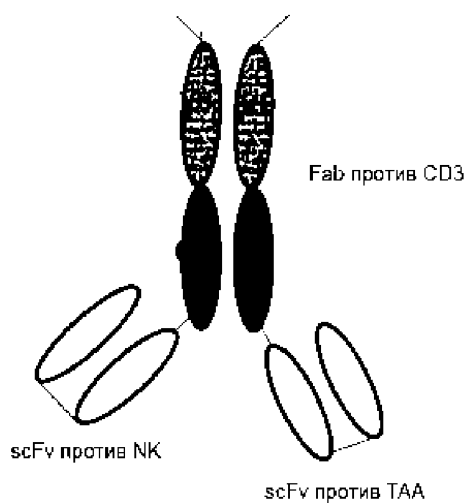
Фиг. 6А



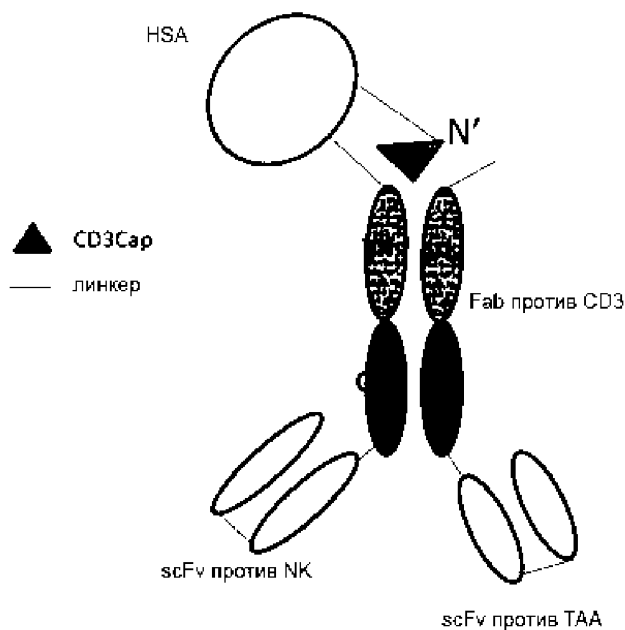
Фиг. 6В



Фиг. 7



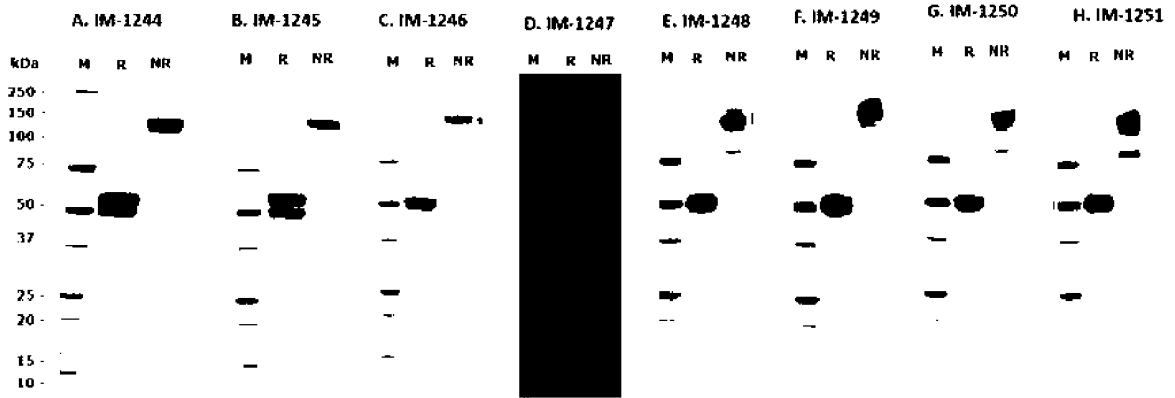
Фиг. 8А



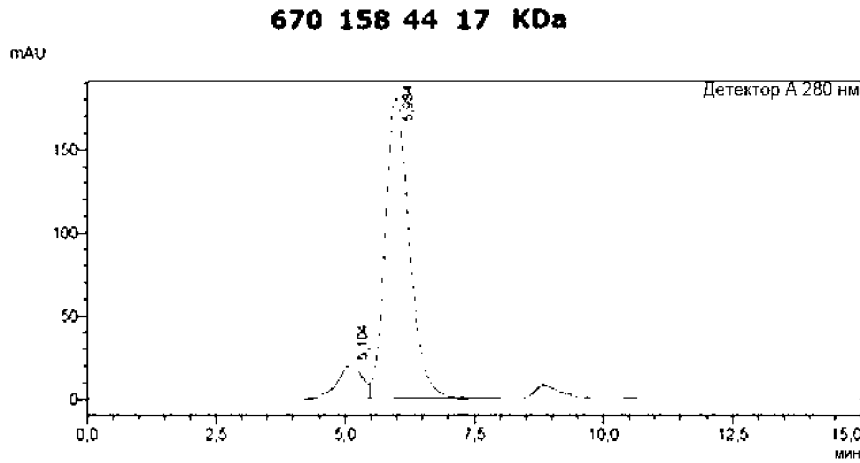
Фиг. 8В

IM1244	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (L-H)
IM1245	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (H-L)
IM1246	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (L-H)
IM1247	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (H-L)
IM1248	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (L-H)
IM1249	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (H-L)
IM1250	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (L-H)
IM1251	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (H-L)

Фиг. 8С



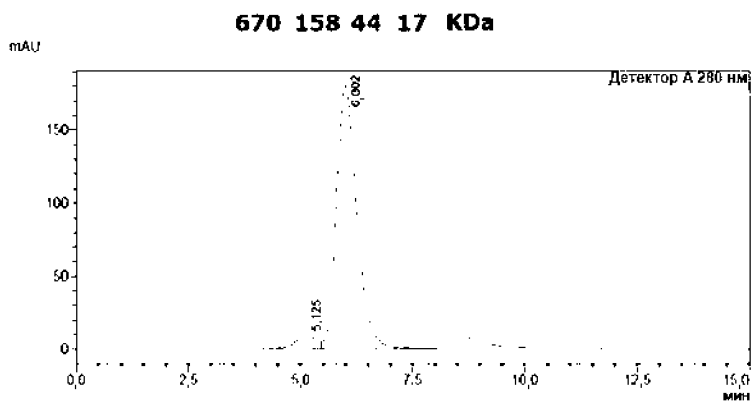
Фиг. 9



Фиг. 10А  
IM1244

<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм				
Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5,104	692 450	10,466	20 330	10,096
5,984	5 923 577	89,534	181 039	89,904
	6 616 027	100,000	201 369	100,000

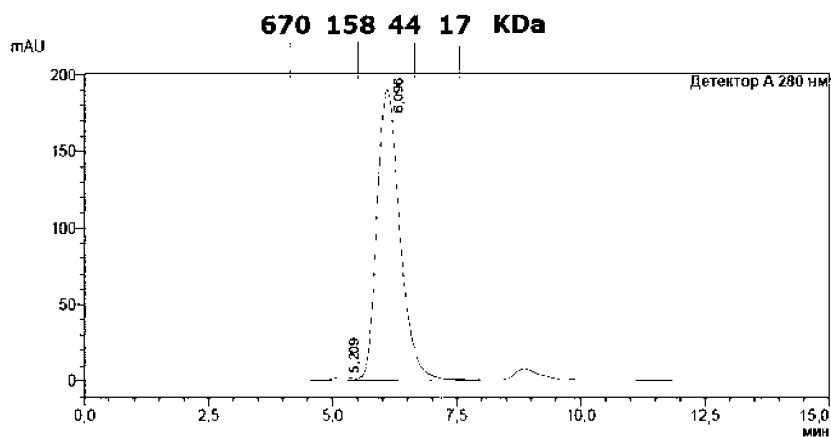


**Фиг. 10В**  
**IM1245**

<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм

Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5.125	312.691	5.204	9466	4.985
6.002	5.636.364	94.796	180.409	95.015
6.009.045		100.000	189.875	100.000

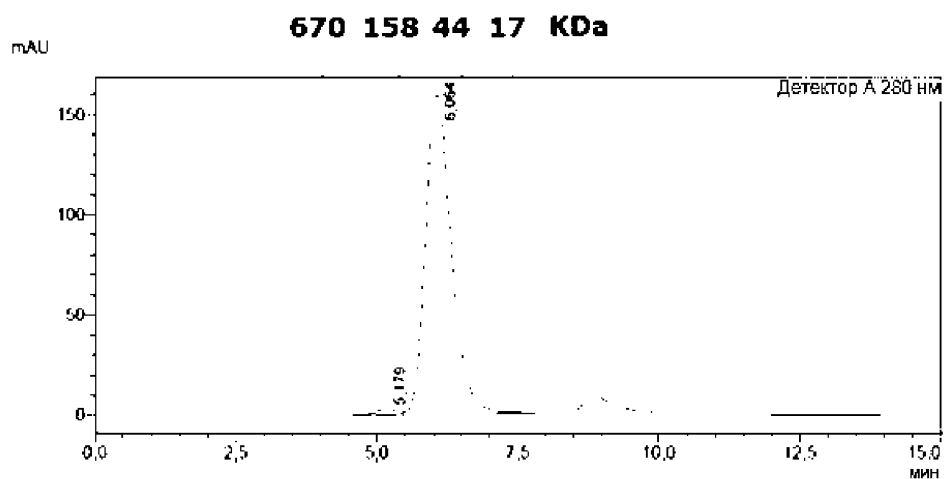


**Фиг. 10С**  
**IM1246**

<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм

Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5.209	72.567	1.168	2577	1.337
6.096	6.139.266	98.832	190.148	98.663
6.211.833		100.000	192.724	100.000



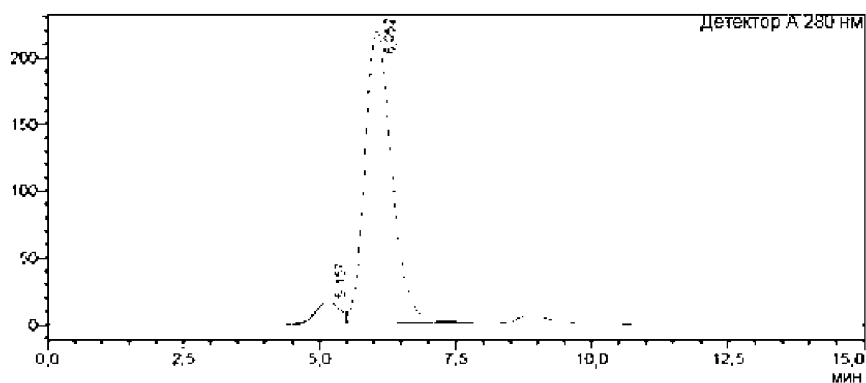
**Фиг. 10D**  
**IM1247**

**<Таблица пиков>**

Детектор А 280 нм

Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5.179	71 599	1.383	2548	1.572
6.064	5 107 295	98.617	159 486	98.428
	5 178 894	100.000	162 034	100.000

**670 158 44 17 KDa**



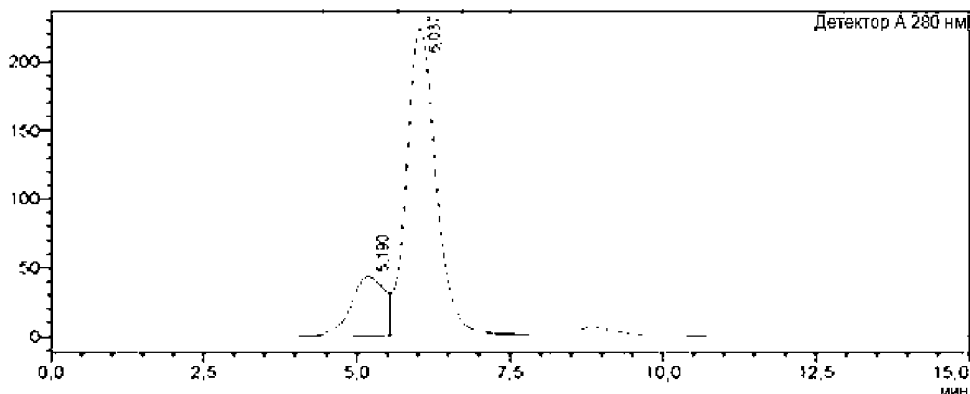
**Фиг. 10E**  
**IM1248**

**<Таблица пиков>**

Детектор А 280 нм

Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5.157	488 295	6.986	15 724	6.666
6.052	7 534 644	93.914	219 155	93.305
	8 022 939	100.000	234 879	100.000

**670 158 44 17 KDa**

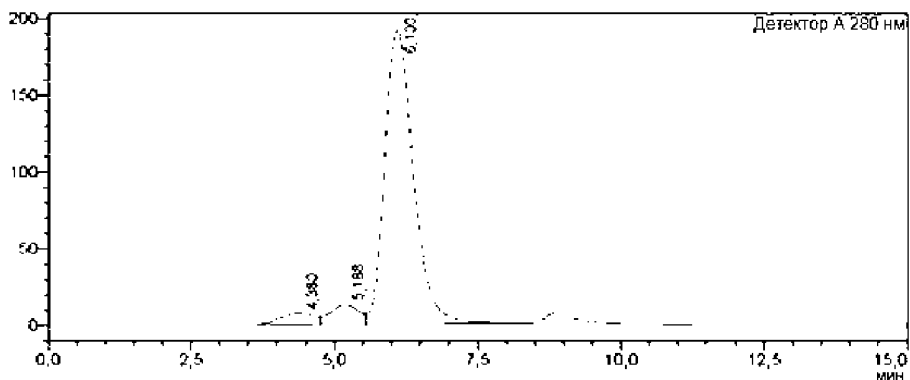


**Фиг. 10F**  
**IM1249**

<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм				
Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
5.190	1 666 319	19.176	43 136	16.176
6.037	7 501 399	81.824	223 525	83.824
	9 167 718	100.000	266 661	100.000

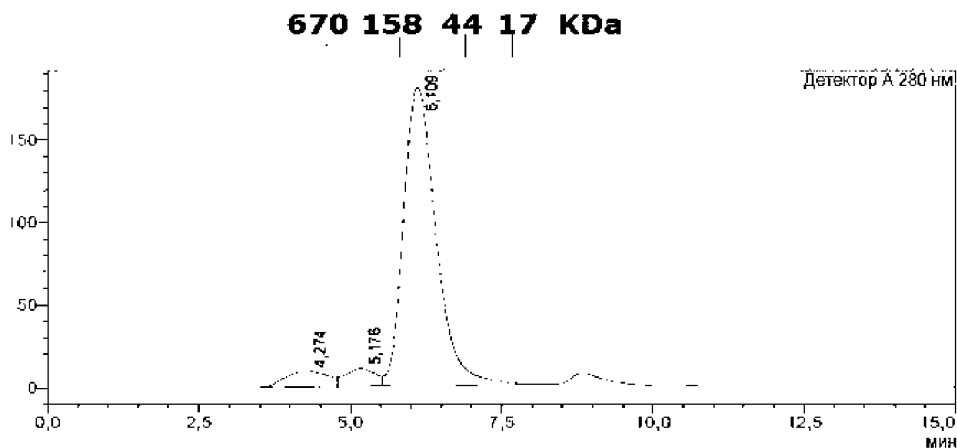
**670 158 44 17 KDa**



**Фиг. 10G**  
**IM1250**

<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм				
Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
4.390	303 006	4.108	6970	3.297
5.188	443 737	6.018	12 825	6.000
6.100	6 626 798	89.873	191 618	90.637
	7 373 541	100.000	211 413	100.000

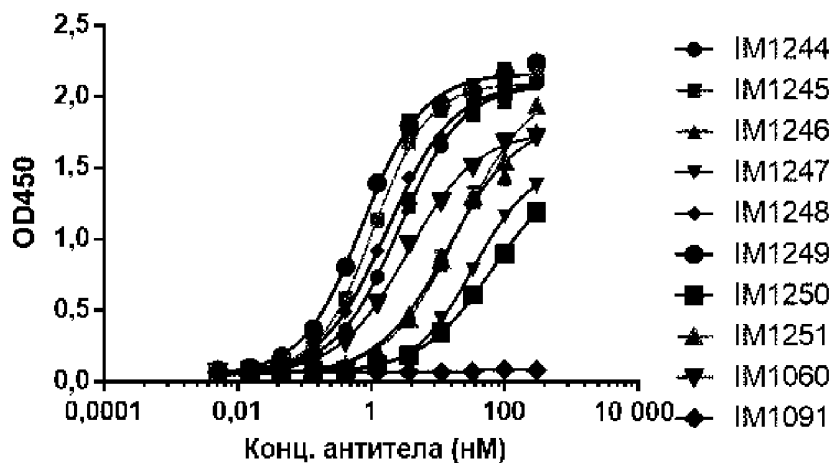


Фиг. 10H  
IM1251

<Таблица пиков>

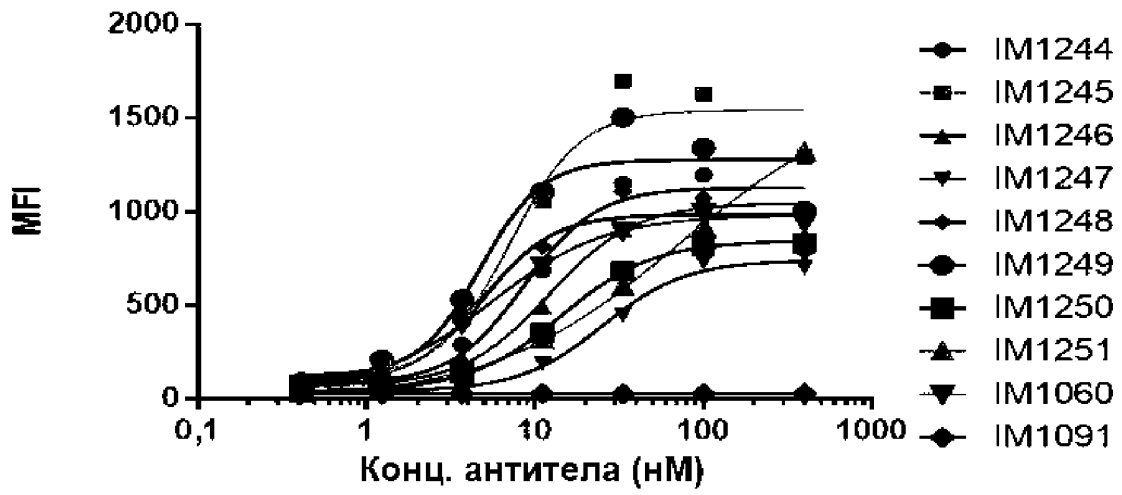
Детектор А 280 нм

Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
4,274	465 229	6,107	9543	4,743
5,176	371 232	4,873	10 588	5,263
6,109	6 781 373	89,020	181 055	89,994
	7 617 834	100,000	201 188	100,000

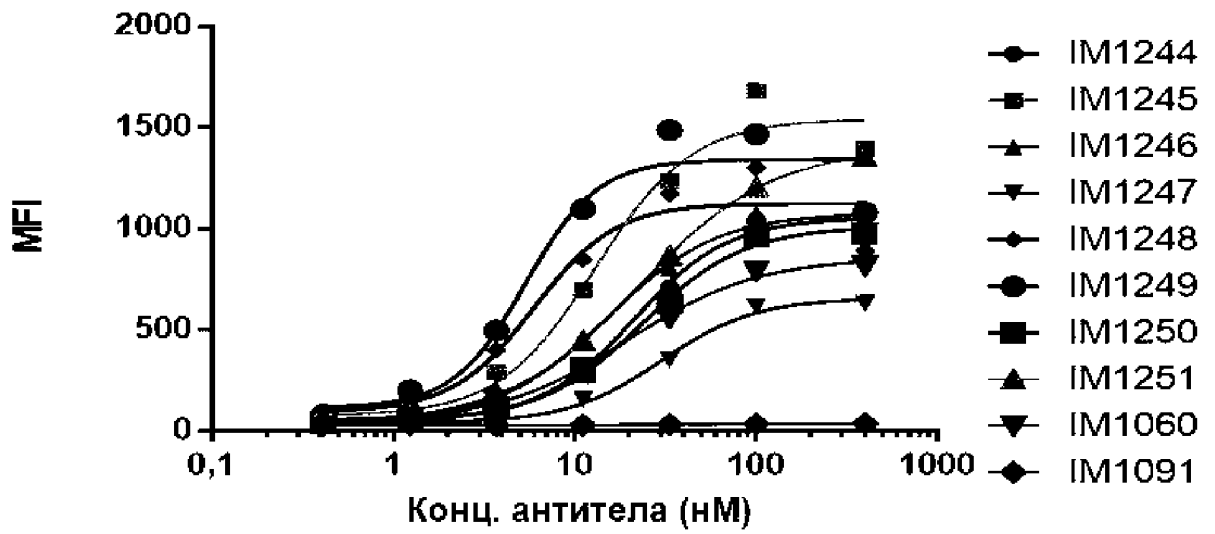


Фиг. 11

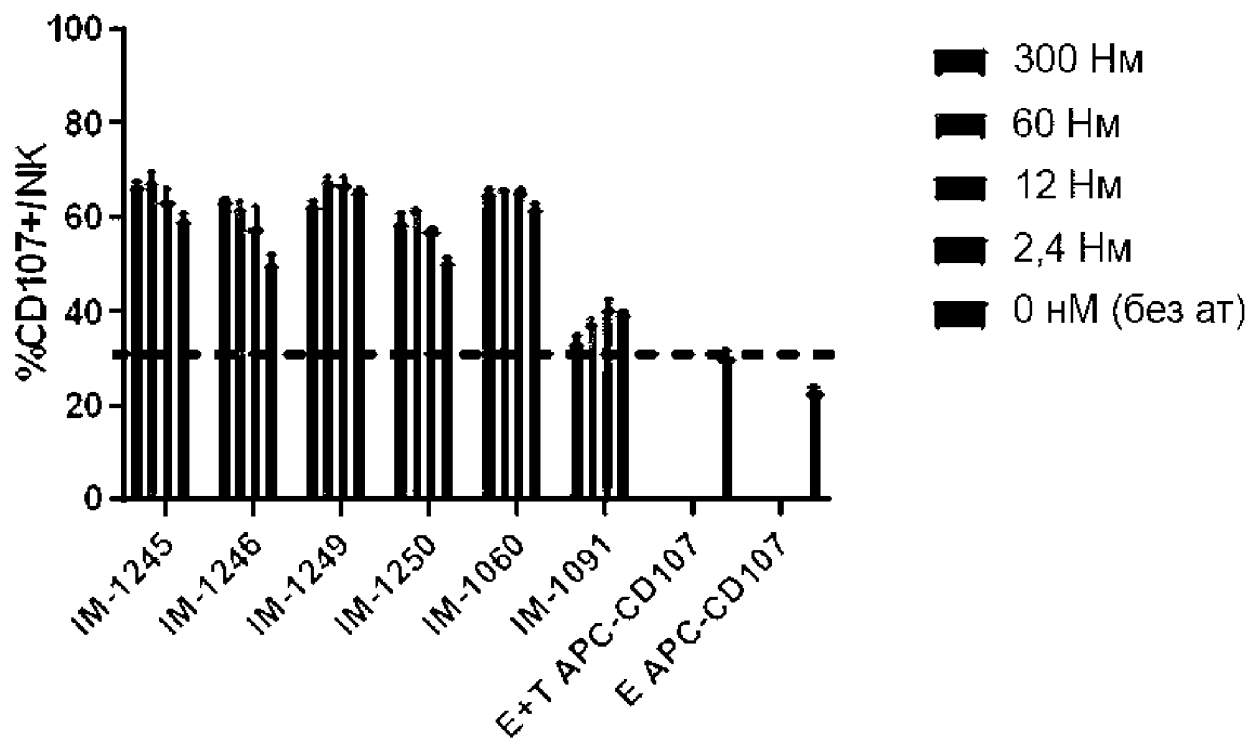




Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 13