

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047799**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.11**

(21) Номер заявки  
**202092147**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.03.12**

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

(54) **ЛЕЧЕНИЕ РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ**(31) **62/642,292**(32) **2018.03.13**(33) **US**(43) **2021.03.04**(86) **PCT/EP2019/056174**(87) **WO 2019/175182 2019.09.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИННЕЙТ ФАРМА (FR)**

(72) Изобретатель:  
**Бойер-Шаммар Аньес (FR), Додион  
Пьер (BE), Кохен Роджер Б (US)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(56) Anonymous: "Archive History for NCT02643550 Study of Monalizumab and Cetuximab in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck", 24 November 2016 (2016-11-24), XP055590273, Retrieved from the Internet: URL: [https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02643550?V\\_3=View#StudyPageTop](https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02643550?V_3=View#StudyPageTop) [retrieved on 2019-05-20] the whole document

ROGER B COHEN ET AL.: "Abstract 5666: Safety of the first-in-class anti-NKG2A monoclonal antibody monalizumab in combination with cetuximab: a phase Ib/II study in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN)", CANCER RESEARCH, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 July 2017 (2017-07-01), XP055590446, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-5666, abstract

Innate Pharma: "R&D Update", 10 April 2014 (2014-04-10), pages 1-108, XP055232714, Retrieved from the Internet: URL: [http://innate-pharma.com/sites/default/files/140410\\_rd\\_day\\_final\\_0.pdf](http://innate-pharma.com/sites/default/files/140410_rd_day_final_0.pdf) [retrieved on 2015-12-01] pages 70, 74

WO-A1-2016062851

WO-A1-2016041947

E.M. LEVY ET AL.: "Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells", INNATE IMMUNITY, vol. 15, no. 2, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 91-100, XP055232683, Us, ISSN: 1753-4259, DOI: 10.1177/1753425908101404

ROBERT L FERRIS ET AL.: "Rationale for combination of therapeutic antibodies targeting tumor cells and immune checkpoint receptors: Harnessing innate and adaptive immunity through IgG1 isotype immune effector stimulation", CANCER TREATMENT REVIEWS, vol. 63, 2 December 2017 (2017-12-02), pages 48-60, XP055590632, DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.11.008

ROGER COHEN ET AL.: "Abstract CT158: Phase II study of monalizumab, a first-in-class NKG2A monoclonal antibody, in combination with cetuximab in previously treated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): Preliminary assessment of safety and efficacy", CANCER RESEARCH, vol. 78, no. 13 Suppl, 18 July 2018 (2018-07-18), page CT158, XP055590269, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-CT158

ANDRÉ PASCALE ET AL.: "Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Antitumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells", CELL, vol. 175, no. 7, 13 December 2018 (2018-12-13), page 1731, XP085560732, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2018.10.014

(57) Данное изобретение относится к применению средств, нацеленных на NKG2A, для лечения видов рака, особенно видов рака шеи и головы, у пациента, получившего предшествующее лечение цетуксимабом. В настоящем изобретении также предусмотрены преимущественные комбинированные схемы применения с нацеленными на NKG2A средствами для лечения видов рака.

**047799**  
**B1**

**047799**  
**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к применению средств, нацеленных на NKG2A, для лечения видов рака, в частности видов рака головы и шеи. В настоящем изобретении также предусмотрены преимущественные комбинированные схемы применения с нацеленными на NKG2A средствами для лечения видов рака.

### Предпосылки изобретения

Активность естественных клеток-киллеров (НК) регулируется с помощью сложного механизма, который предусматривает как активирующий, так и ингибирующий сигналы. Было идентифицировано, что несколько различных рецепторов, специфичных к НК, играют важную роль в распознавании, опосредованном НК-клеткой, и уничтожении клеток-мишеней с дефицитом HLA класса I. Природные рецепторы цитотоксичности (NCR) относятся к классу активирующих рецепторных белков и генам, экспрессирующим их, которые специфически экспрессируются в НК-клетках. Примеры NCR включают NKp30, NKp44 и NKp46 (см., например, Lanier (2001) *Nat Immunol* 2:23-27). Другим важным активирующим рецептором, вовлеченным в лизис клеток-мишеней с помощью НК-клеток, является NKG2D. NKG2D распознает антигены, родственныеглавному комплексу гистосовместимости (MHC) I класса, из семейств белков MICА/B и ULBP; причем последние представляют собой белки, связанные со стрессом, которые способны действовать как опухолеспецифические антигены, позволяя НК-клеткам распознавать и устранять клетки опухоли.

CD94/NKG2A представляет собой ингибирующий рецептор, найденный на подгруппах естественных клеток-киллеров (НК-клеток), естественных Т-киллеров (NKT-клеток) и Т-клеток ( $\alpha/\beta$  и  $\gamma/\delta$ ). CD94/NKG2A ограничивает высвобождение цитокина и цитотоксические ответы вышеуказанных лимфоцитов в отношении клеток, экспрессирующих CD94/NKG2A-лиганд HLA-E (см., например, WO99/28748). Также было обнаружено, что HLA-E секретируется в растворимой форме некоторыми клетками опухоли (Derge et al., *J Immunol* 2006; 177:3100-7) и активируется эндотелиальными клетками (Coupel et al., *Blood* 2007; 109:2806-14). Антитела, которые ингибируют передачу сигнала CD94/NKG2A, могут повысить уровень высвобождения цитокина и цитолитической активности лимфоцитов в отношении HLA-E-положительных клеток-мишеней, например, ответы CD94/NKG2A-положительных НК-клеток в отношении инфицированных вирусом клеток. Следовательно, терапевтические антитела, которые ингибируют CD94/NKG2A, но которые не вызывают уничтожение клеток, экспрессирующих CD94/NKG2A (т.е. неистощающие антитела), могут индуцировать контроль роста опухоли у пациентов, больных раком.

Различные антитела к NKG2A описаны в уровне техники. В WO 2008/009545 описано гуманизованное антитело Z270 к NKG2A, при этом в WO 2009/092805 описано гуманизованное антитело Z199 к NKG2A. Vance et al. (*J Exp Med* 1999; 190: 1801-12) относится к антителу крысы 20D5 к NKG2 мыши (сейчас коммерчески доступно посредством BD Biosciences Pharmingen, номер по каталогу 550518, США); а в публикации заявки на патент США 20030095965 описано мышье антитело 3S9, которое предположительно связывается с NKG2A, NKG2C и NKG2E.

Плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC) характеризуется частотой возникновения приблизительно 60000 случаев в год и показателем смертности, составляющим приблизительно 50%. Основными факторами риска в отношении HNSCC является курение табака, употребление алкоголя и инфицирование вирусом папилломы человека (HPV). Несмотря на успехи в изучении эпидемиологии и патогенеза, уровень выживаемости для множества типов HNSCC незначительно улучшился за последние сорок лет. Показатель общей 5-летней выживаемости пациентов, страдающих HNSCC, составляет всего приблизительно 50%. Курение табака, употребление алкоголя и вирусные возбудители являются основными факторами риска для развития HNSCC. Такие факторы риска вместе с генетической предрасположенностью приводят к накоплению множества генетических и эпигенетических изменений в ходе многоэтапного процесса развития рака, и понимание такого молекулярного канцерогенеза HNSCC применяется для разработки нацеливающихся средств для лечения HNSCC.

Идея применения иммунотерапии в качестве лечения HNSCC существует в течении десятилетий, и попытки лечения HNSCC включают нацеливание опухолеспецифических антигенов. Хотя были достигнуты улучшения в применении таких стратегий иммуностимулирующего лечения различных солидных видов рака, применение таких стратегий в отношении пациентов, страдающих плоскоклеточным раком головы и шеи (HNSCC), отстает. Иммунотерапевтические подходы в отношении HNSCC особенно осложняются значительной иммуносупрессией, которая индуцирована посредством HNSCC, что потенциально снижает эффективность иммуностимулирующей активности. Обзор механизмов, посредством которых HNSCC избегает противоопухолевого иммунного ответа, таких как супрессирующая модуляция HLA I класса, представлен в Duray et al. (2010) *Clin. Dev. Immunol. Article ID 701657*; 2010: 1-15.

Стандарт оказания медицинской помощи для HNSCC включает виды химиотерапии на основе цисплатина, включая комбинации с цетуксимабом для лечения метастатической HNSCC. Для лечения неоперабельного неметастатического HNSCC, виды лечения включают виды химиотерапии на основе цисплатина, а также комбинацию цетуксимаба с лучевой терапией. Антитело c225 (цетуксимаб, ERBITUX®) представляет собой антитело к EGFR, демонстрирующее ингибирование EGF-опосредованного роста

клеток опухоли *in vitro*, которое было одобрено FDA для лечения рака головы и шеи в 2011. Считается, что цетуксимаб действует посредством блокирования онкогенной передачи сигналов рецепторного пути EGF и путем индуцирования опосредованной рецептором Fc $\gamma$  антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Однако при HNSCC ADCC может воздействовать путем индуцированной значительной иммуносупрессии. В то же время Vantourout et al., *Sci. Transl. Med.* 6: 231ra49 (2014) сообщают, что блокирование онкогенной передачи сигнала рецепторного пути EGF приводит к посттранскрипционной регуляции в клетках опухоли антигенов, относящихся к главному комплексу гистосовместимости (МНС) I класса, из семейства белков MICA/B и ULBP, которые распознаются активирующим рецептором NKG2D на NK-клетках и подгруппах T-клеток. В частности, экспрессия клетками опухоли таких антигенов, связанных со стрессом, которые являются природными лигандами NKG2D, снижается с помощью клинических ингибиторов EGFR, таким образом потенциально уменьшая видимость клеток опухоли для NK и T-клеток.

Однако, поскольку множество пациентов, страдающих HNSCC, получают различные результаты лечения, несмотря на одобренные в настоящее время виды терапии, в данном уровне техники существует необходимость в идентификации популяций пациентов, которым лечение иммунотерапевтическими средствами могло бы принести большую пользу.

#### **Краткое описание настоящего изобретения**

Настоящее изобретение возникает, помимо прочего, из наблюдения, что блокада ингибирующего рецептора NKG2A с применением антитела к NKG2A в комбинации с цетуксимабом обеспечивает клинический ответ у пациентов, страдающих раком, в частности раком головы и шеи, и особенно HNSCC, в том числе у пациентов, ранее подвергавшихся терапии с применением препарата на основе платины, и у которых рак прогрессирует (например, не проявил ответ, рецидивировал или прогрессировал иным образом). Кроме того, комбинация антитела к NKG2A в комбинации с цетуксимабом вызывает клинические ответы даже у пациентов с прогрессирующим раком во время или после предшествующего лечения с помощью цетуксимаба. В некоторых вариантах осуществления пациент мог ранее лечиться с помощью цетуксимаба и/или химиотерапевтического средства (например, терапии с применением препарата на основе платины) или цетуксимаба и лучевой терапии. В одном варианте осуществления виды комбинированной терапии, раскрытые в данном документе, могут быть особенно полезны для применения при лечении популяции пациентов, страдающих неизлечимым неоперабельным и/или метастатическим HNSCC, при этом необязательно дополнительно пациент подвергался терапии с применением препарата на основе платины, лучевой терапии и/или лечению с помощью цетуксимаба.

Соответственно, в одном аспекте нейтрализующее антитело к NKG2A в комбинации с цетуксимабом может обеспечить значительное уменьшение интенсивности рака в популяции индивидуумов, характеризующейся неоперабельным (например, неизлечимым, неоперабельным и/или метастатическим) раком головы и шеи, в частности HNSCC, где рак считается устойчивым к цетуксимабу. Данное комбинированное лечение может обеспечить возможность для значительной части популяции индивидуумов, страдающих раком головы и шеи, особенно HNSCC, у которых рак прогрессирует, несмотря на лечение с помощью цетуксимаба. В частности, комбинированное лечение может быть полезным для предотвращения дальнейшего прогрессирования, в частности для отсрочки или предотвращения метастатического рака (например, у индивидуумов, страдающих от неметастатического рака).

Представленные в данном документе способы лечения рака головы и шеи у индивидуумов, страдающих от рака головы и шеи. В одном варианте осуществления рак является неоперабельным (рак головы и шеи, который не может быть полностью удален посредством хирургии). В одном варианте осуществления представлен способ уменьшения опухолевой нагрузки (например, уменьшение суммы диаметров очагов поражения клеток-мишеней по сравнению с исходной суммой диаметров) у индивидуума, страдающего неоперабельным и/или метастатическим раком головы и шеи.

В одном варианте осуществления способ включает лечение рака головы и шеи у индивидуума, при этом способ включает введение индивидууму терапевтически активного количества средства, которое нейтрализует ингибирующую активность полипептида NKG2A человека, в комбинации с цетуксимабом. В одном варианте осуществления индивидуум страдает раком, который прогрессировал во время или после предшествующего курса лечения с помощью цетуксимаба (предшествующий курс лечения с помощью цетуксимаба не включает введение соединения, которое нейтрализует активность NKG2A, но оно может быть введено в комбинации с другими видами лечения, в частности лучевой терапией и/или химиотерапией). В одном варианте осуществления в дополнение к предшествующему курсу терапии с помощью цетуксимаба (необязательно объединенному с химиотерапевтическим средством или лучевой терапией), индивидуум получал дополнительный предшествующий курс терапии с помощью химиотерапевтического средства; например, индивидуум получал первый предшествующий курс терапии с помощью средства на основе платины, с последующим вторым предшествующим курсом терапии с помощью цетуксимаба. В одном варианте осуществления рак представляет собой неоперабельный (например, неизлечимый, неоперабельный) и/или метастатический рак головы и шеи.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения рака головы и шеи у индивидуума, страдающего неоперабельным, необязательно неметастатическим раком головы и шеи, в частности

HNSCC, при этом способ включает введение индивидууму: (A) терапевтически активного количества средства, которое нейтрализует активность полипептида NKG2A человека, (b) терапевтически активного количества цетуксимаба. В одном варианте осуществления индивидуум ранее получал лечение химиотерапевтическим средством (например, терапия с применением препарата на основе платины), лучевой терапии и/или цетуксимаба (например, предшествующий курс лечения, который включает введение этого химиотерапевтического средства, лучевую терапию и/или цетуксимаба) и рак головы и шеи которых прогрессирует во время или после такого предшествующего лечения. В одном варианте осуществления индивидуум страдает раком головы и шеи, который не проявляет ответ или недостаточно проявляет ответ на лечение с помощью такого химиотерапевтического средства, лучевой терапии и/или цетуксимаба. В одном варианте осуществления индивидуум страдает раком головы и шеи, который рецидивировал после лечения с помощью такого химиотерапевтического средства, лучевой терапии и/или цетуксимаба. В одном примере индивидуум получал предшествующий курс лечения, который включал введение химиотерапевтического средства (например, терапия с применением препарата на основе платины), лучевую терапию и/или лечение с помощью цетуксимаба, и испытал прогрессирование или рецидив рака после завершения курса лечения, например, в течение 3 лет или менее после завершения курса лечения. В одном варианте осуществления индивидуум получал цетуксимаб, комбинированный с лучевой терапией. В одном варианте осуществления индивидуум получал терапию с применением препарата на основе платины с последующей или терапией цетуксимабом или в комбинации с ней. В другом варианте осуществления индивидуум ранее получал лечение цетуксимабом.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения рака головы и шеи у индивидуума, страдающего раком головы и шеи, который ранее получал лечение с помощью цетуксимаба (например, предшествующий курс лечения, который включает введение цетуксимаба), и рак которого прогрессирует, при этом способ включает введение индивидууму: (A) терапевтически активного количества средства, которое нейтрализует активность полипептида NKG2A человека, (b) терапевтически активного количества цетуксимаба. В одном примере индивидуум, страдающий раком головы и шеи, получал предшествующий курс лечения, который включал введение цетуксимаба, и не получал ответ или не получал достаточного ответа на такое лечение. В одном примере индивидуум получал предшествующий курс лечения, включающий введение цетуксимаба, и который испытал прогрессирование или рецидив рака во время или после указанного курса лечения, который включал введение цетуксимаба. В одном примере индивидуум получал предшествующий курс лечения, включающий введение цетуксимаба, и испытал прогрессирование рака или рецидив после завершения указанного предшествующего курса лечения, который включал введение цетуксимаба, например в течение 3 лет после завершения указанного предшествующего курса лечения. Предшествующий курс лечения, который включал введение цетуксимаба, может, например, включать введение цетуксимаба, комбинированного с лучевой терапией. В одном варианте осуществления предшествующий курс лечения, который включал введение цетуксимаба, включает введение цетуксимаба, комбинированного с лучевым и/или химиотерапевтическим средством, например, средством на основе платины.

В одном варианте осуществления представлен способ для лечения или предупреждения прогрессирования HNSCC у индивидуума, включающий: (i) идентификацию индивидуума, который страдает HNSCC, устойчивым к лечению с помощью цетуксимаба (например, прогрессирование, несмотря на лечение с помощью цетуксимаба, необязательно цетуксимаба, комбинированного с лучевой терапией и/или химиотерапией), и (ii) введение индивидууму эффективного количества средства, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, в комбинации с цетуксимабом. В одном варианте осуществления индивидуум из стадии (i) имеет неоперабельный, метастатический рак головы и шеи. В одном варианте осуществления индивидуум из стадии (i) имеет неоперабельный и метастатический рак головы и шеи.

В другом варианте осуществления представлен способ определения того, может ли индивидуум (или, например, популяция индивидуумов), страдающий HNSCC, необязательно неоперабельным раком головы и шеи, необязательно метастатическим раком головы и шеи, необязательно метастатическим раком головы и шеи, получать определенную пользу от, быть восприимчивым к и/или подходить для лечения с помощью средства, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, в комбинации с цетуксимабом, при этом способ включает определение того, страдает ли индивидуум(индивидуумы) раком головы и шеи, который устойчив к цетуксимабу (например, цетуксимабу в качестве монотерапии, цетуксимабу в комбинации с лучевой терапией и/или цетуксимабу в комбинации с химиотерапией), при этом определение, того, что индивидуум(индивидуумы) страдает раком головы и шеи, который устойчив к цетуксимабу, указывает на то, что индивидуум(индивидуумы) может получать определенную пользу от, быть восприимчивым к и/или подходить для лечения с помощью средства, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, в комбинации с цетуксимабом. Необязательно способ дополнительно включает стадию введения средства, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, в комбинации с цетуксимабом, индивидууму, для которого определено, что он получает определенную пользу от, восприимчив к и/или подходит для такого лечения.

Также в данном документе представлены композиции для применения в лечении заболевания, например рака, устойчивого к цетуксимабу. В некоторых вариантах осуществления представлено средство,

которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и/или цетуксимаб для применения в лечении HNSCC индивидуума, у которого рак HNSCC устойчив к лечению (например, предшествующему лечению) с помощью цетуксимаба (например, отдельно цетуксимабом или в комбинации с другим средством, таким как химиотерапия или лучевая терапия). В одном варианте осуществления представлено средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, для применения в лечении рака у индивидуума, получавшего предшествующее лечение с помощью цетуксимаба. В одном варианте осуществления средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, вводят в комбинации с цетуксимабом. В одном варианте осуществления представлено средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, для применения в лечении HNSCC у индивидуума-человека, получавшего предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, при этом лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (б) цетуксимаба. В одном варианте осуществления рак или карцинома представляет собой HNSCC. В одном варианте осуществления представлено средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека для применения в лечении рака у человека, имеющего неоперабельную, необязательно неметастатическую карциному, при этом лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (б) цетуксимаба. В одном варианте осуществления рак или карцинома представляет собой HNSCC. В одном варианте осуществления представлен цетуксимаб для применения в лечении HNSCC у индивидуума, получавшего предшествующее лечение (например, первый курс лечения с помощью цетуксимаба), где указанное лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (б) цетуксимаба (например, второй курс лечения с помощью цетуксимаба).

В любом варианте осуществления в данном документе индивидуум характеризуется как страдающий раком HNSCC, который прогрессирует, несмотря на лечение с помощью цетуксимаба. Необязательно индивидуум страдает раком HNSCC, который прогрессирует, несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, комбинированного с лучевой терапией.

В любом варианте осуществления в данном документе рак головы и шеи, который устойчив к лечению с помощью цетуксимаба, представляет собой рак, который прогрессировал или рецидивировал во время или после предшествующего курса лечения, который включал лечение с помощью цетуксимаба. В одном примере рак, устойчивый к лечению с помощью цетуксимаба, представляет собой рак, который прогрессировал или рецидивировал после завершения предшествующего курса лечения, включающего лечение с помощью цетуксимаба, например, в течение 3 лет или меньше. Например, рак может прогрессировать в течение 2 лет или в течение 12 месяцев, 6 месяцев, 4 месяцев, или 3 месяцев после завершения предшествующего курса лечения, включающего лечение с помощью цетуксимаба. Необязательно рецидивирующий рак представляет собой рак, который не является новым первичным раком, но представляет собой рецидивирование исходного HNSCC. Необязательно рецидивирующий рак представляет собой рак в той же области и/или латеральности (например, правой или левой стороне). Предшествующий курс лечения, который включал введение цетуксимаба, может, например, включать введение цетуксимаба, комбинированного с лучевой терапией. Предшествующий курс лечения, который включал введение цетуксимаба, может, например, включать введение цетуксимаба, комбинированного с химиотерапией, например, терапией с применением препарата на основе платины.

В одном аспекте любого из вариантов осуществления в данном документе лечение по настоящему изобретению вызывает уменьшение опухолевой нагрузки, необязательно уменьшение суммы диаметров очагов поражения клеток-мишеней по сравнению с исходной суммой диаметров. В одном варианте осуществления лечение задерживает прогрессирование рака. В одном варианте осуществления лечение задерживает или предотвращает метастазирование при раке. В одном варианте осуществления лечение путем уменьшения роста или задержки роста рака улучшает показатели симптомов или самочувствия пациента.

В любом варианте осуществления в данном документе индивидуума можно охарактеризовать как получавший предшествующую терапию с применением препарата на основе платины (и, возможно, может страдать раком, который прогрессирует, несмотря на такую терапию). Терапия с применением препарата на основе платины может включать, например, введение по схеме лечения, включающей цисплатин или карбоплатин, например, в схеме, включающей средство на основе платины и дополнительно паклитаксел, доцетаксел, гемцитабин или 5FU (5-фторурацил).

В одном варианте осуществления представлен способ лечения HNSCC у индивидуума, включающий:

(а) введение индивидууму цетуксимаба (например, введение по циклу или курсу терапии, включающему цетуксимаб, необязательно по курсу терапии, включающему цетуксимаб и лучевую терапию или, включающему цетуксимаб и химиотерапию); и

(б) случай, если рак у индивидуума на стадии (а) устойчив к цетуксимабу (например, к курсу терапии на стадии (а)), необязательно при этом пациент страдает раком, который прогрессирует, распространяется на другие органы или не реагирует), введение индивидууму терапевтически активного количества

средства, которое нейтрализует активность полипептида NKG2A человека, в комбинации с терапевтически активным количеством цетуксимаба.

В одном варианте осуществления индивидуум страдает нематастатическим HNSCC.

В одном варианте осуществления индивидуум получил предшествующую терапию с применением препарата на основе платины (например, и рак прогрессировал, несмотря на такую терапию).

В одном варианте осуществления лечение с помощью цетуксимаба на стадии (а) включает комбинированное лечение с лучевой терапией и/или химиотерапией.

В одном варианте осуществления любого аспекта в данном документе средство, которое нейтрализует ингибирующую активность полипептида NKG2A человека, представляет собой антитело, способное связываться с NKG2A. В одном аспекте средство, которое нейтрализует ингибирующую активность полипептида NKG2A человека, представляет собой неистощающее антитело (например, антитело, с отсутствующим Fc-доменом или обладающее Fc-доменом, характеризующееся минимальным связыванием или отсутствием связывания с одним или несколькими Fcγ-рецепторами).

В одном варианте осуществления рак представляет собой опухоль ротоглотки, опухоль гортани, опухоль ротовой полости, опухоль носоглотки, или опухоль гипофаринкса. В одном варианте осуществления FINSCC представляет собой SCC ротовой полости (OCSCC). OCSCC включает плоскоклеточную карциному губ, передней 2/3 языка, дна ротовой полости, слизистой оболочки щеки, десны, твердого неба и ретромолярного треугольника.

В одном варианте осуществления FINSCC представляет собой нематастатический рак.

В одном варианте осуществления индивидуум является положительным в отношении вируса папилломы человека (FLPV) (например, характеризуется присутствием вируса папилломы человека, положительным в отношении генотипа HPV, связанного с высоким риском возникновения рака, положительным в отношении генотипа FLPV16 и/или положительным в отношении экспрессии P16<sup>INKa</sup>).

В одном варианте осуществления индивидуум является отрицательным в отношении вируса папилломы человека (FLPV) (например, характеризуется отсутствием вируса папилломы человека, отсутствием генотипа HPV, связанного с высоким риском возникновения рака, отрицательным в отношении генотипа FLPV16 и/или отрицательным в отношении экспрессии P16<sup>INKa</sup>).

В одном варианте осуществления индивидуум страдает раком головы и шеи, характеризующимся присутствием лимфоцитов в опухолевом окружении (например, в пределах ткани опухоли и/или в пределах ткани, смежной с опухолью).

В одном варианте осуществления антитело к NKG2A вводят в количестве, которое приводит к нейтрализации ингибирующей активности CD94/NKG2A человека у пациента-человека (*in vivo*), при этом необязательно антитело к NKG2A вводят в дозе, которая приводит к насыщению полипептидов NKG2A на NK и Т-лимфоцитах периферической крови в течение по меньшей мере двух недель, необязательно по меньшей мере четырех недель. В одном варианте осуществления антитело к NKG2A вводят в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг, необязательно приблизительно 4 мг/кг, необязательно приблизительно 10 мг/кг. В одном варианте осуществления антитело к NKG2A вводят в фиксированной дозе в диапазоне 100-1000 мг, необязательно в диапазоне 200-1200 мг, например, 750 мг.

Необязательно статус HLA-E рака можно оценить до лечения с помощью средства, направленного против NKG2A. В одном варианте осуществления представлен способ, объединяющий стадию обнаружения HLA-E для идентификации пациентов, страдающих HLA-E+ HNSCC; после этого этих пациентов можно лечить с помощью средства, которое нейтрализует ингибирующую активность полипептида NKG2A.

В одном варианте осуществления средство, которое нейтрализует активность полипептида NKG2A человека, представляет собой антитело к NKG2A, которое вводят в эффективном количестве, что приводит к нейтрализации ингибирующей активности CD94/NKG2A человека у пациента-человека (*in vivo*), при этом необязательно антитело к NKG2A вводят в дозе, которая приводит к нейтрализации NKG2A в NK и Т-лимфоцитах периферической крови в течение по меньшей мере двух недель, необязательно по меньшей мере четырех недель. В одном аспекте комбинацию вводят (или она предназначена для введения) в соответствии с конкретной клинической схемой введения, в частности, в конкретном количестве дозы и в соответствии с конкретным режимом дозирования (например, в количестве дозы и/или в соответствии с конкретным режимом дозирования, представленным в данном документе).

В одном варианте осуществления средство, которое нейтрализует активность полипептида NKG2A человека, представляет собой антитело, которое снижает ингибирующую активность NKG2A путем блокирования связывания его лиганда HLA-E, т.е. антитело к NKG2A препятствует связыванию NKG2A посредством HLA-E. Антитело, имеющее тяжелые цепи по любому из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7 представляет собой пример такого антитела. В одном варианте осуществления антитело к NKG2A снижает ингибирующую активность NKG2A без блокирования связывания его лиганда HLA-E, т.е. средство, направленное против NKG2A, представляет собой неконкурентный антагонист и не препятствует связыванию NKG2A посредством HLA-E. Антитело, имеющее переменные области легкой и тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, представляет собой пример такого антитела.

В одном варианте осуществления средство, направленное против NKG2A, представляет собой ан-

титело, которое связывается со значительно более высокой аффинностью с NKG2A, чем с одним или несколькими активирующими рецепторами NKG2. Например, в одном варианте осуществления средство представляет собой антитело, которое связывается со значительно более высокой аффинностью с NKG2A, чем с NKG2C. В дополнительном или альтернативном варианте осуществления средство представляет собой антитело, которое связывается со значительно более высокой аффинностью с NKG2A, чем с NKG2E. В дополнительном или альтернативном варианте осуществления средство представляет собой антитело, которое связывается со значительно более высокой аффинностью с NKG2A, чем с NKG2H. Антитело, имеющее тяжелые цепи под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7 соответственно, связывает NKG2A без непосредственного связывания с NKG2C, NKG2E или NKG2H.

В дополнительном или альтернативном варианте осуществления средство, направленное против NKG2A, конкурирует с антителом, имеющим тяжелые цепи под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7, и/или антителом, имеющим вариабельные области легкой и тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно, в связывании с CD94/NKG2A. Средство может быть, например, человеческим или гуманизированным антителом к NKG2A.

В одном варианте осуществления антитело к NKG2A представляет собой гуманизованное антитело, имеющее тяжелые цепи под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7. Иллюстративные остатки или последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) и/или сайты для аминокислотных замен в каркасной области (FR) таких гуманизованных антител, характеризующихся улучшенными свойствами, такими как, например, более низкая иммуногенность, улучшенное связывание антигена или другие функциональные свойства, и/или улучшенными физико-химическими свойствами, такими как, например, лучшая стабильность.

В других вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции и наборы, а также способы их применения.

Эти аспекты более точно описаны в, а дополнительные аспекты, признаки и преимущества будут очевидными из описания настоящего изобретения, представленного в данном документе.

#### Определения

Если применяют термин "содержащий", его можно необязательно заменить терминами "по сути состоящий из" или "состоящий из".

NKG2A (OMIM 161555, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки) является представителем группы NKG2 транскриптов (Houchins, et al. (1991) J. Exp. Med. 173:1017-1020). NKG2A кодируется 7 экзонами, охватывающими 25 kb, демонстрируя некоторый дифференциальный сплайсинг. Вместе с CD94, NKG2A образует гетеродимерный ингибирующий рецептор CD94/NKG2A, обнаруженный на поверхности подгрупп NK-клеток,  $\alpha/\beta$  T-клеток,  $\gamma/\delta$  T-клеток и NKT-клеток. Подобно ингибирующим рецепторам KIR, он имеет ITIM в своем цитоплазматическом домене. Применяемый в данном документе термин "NKG2A" относится к любому варианту, производному или изоформе гена NKG2A или кодируемого белка. Также охватываются любые последовательности нуклеиновой кислоты или белка с одним или несколькими биологическими свойствами или функциями с диким типом, полноразмерным NKG2A и с по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой нуклеотидной или аминокислотной идентичностью. NKG2A человека содержит 233 аминокислоты в 3 доменах, при этом цитоплазматический домен содержит остатки 1-70, трансмембранный участок содержит остатки 71-93 и внеклеточная область содержит остатки 94-233 следующей последовательности:

```
MDNQGVVYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDKTY
HCKDLPSAPEKLIVGILGIIICLILMASVVTVVIPSTLIQRHNSSLNTRTQKARHCGHCPE
EWITYNSCYYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSH
HPWVTMNGLAFAKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRKSAQCGSSIIYHCKHKL (SEQ ID
NO:1).
```

NKG2C (OMTM 602891, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки) и NKG2E (OMTM 602892, полное описание которого включено в данный документ посредством ссылки) являются двумя другими членами группы NKG2 транскриптов (Gilenke, et al. (1998) Immunogenetics 48:163-173). Рецепторы CD94/NKG2C и CD94/NKG2E являются активирующими рецепторами, обнаруженными на поверхности подгруппы лимфоцитов, например NK-клетках и T-клетках.

HLA-E (OMIM 143010, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки) представляет собой неклассическую молекулу МНС, которая экспрессируется на поверхности клетки и регулируется посредством связывания пептидов, например, фрагментами, полученными из сигнальной последовательности других молекул МНС I класса. Растворимые варианты HLA-E также были идентифицированы. В дополнение к его свойствам связывания рецептора T-клетки, HLA-E связывает подгруппу естественных клеток-киллеров (NK), естественных T-киллеров (NKT) и T-клеток ( $\alpha/\beta$  и  $\gamma/\delta$ ) путем

специфического связывания с CD94/NKG2A, CD94/NKG2B и CD94/NKG2C (см., например, Braud et al. (1998) Nature 391:795-799, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки). Экспрессия HLA-E на поверхности защищает клетки-мишени от лизиса клетками-клонами CD94/NKG2A+ NK, T или NKT. Применяемый в данном документе термин "HLA-E" относится к любому варианту, производному или изоформе гена HLA-E или кодируемого белка. Также охватываются любые последовательности нуклеиновой кислоты или белка с одним или несколькими биологическими свойствами или функциями с диким типом, полноразмерным HLA-E и с по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой нуклеотидной или аминокислотной идентичностью.

В контексте настоящего изобретения "CD94/NKG2A-положительный лимфоцит" относится к клеткам лимфоидной линии (например, NK-, NKT- и T-клеткам), экспрессирующим CD94/NKG2A на клеточной поверхности, которые можно выявить с помощью, например, проточной цитометрии с применением антител, которые специфически распознают объединенный эпитоп на CD94 и NKG2A или эпитоп только на NKG2A. "CD94/NKG2A-положительный лимфоцит" также включает бессмертную клеточную линию лимфоидного происхождения (например, NKL, NK-92).

В контексте настоящего изобретения термин "снижает ингибирующую активность NKG2A", "нейтрализует NKG2A" или "нейтрализует ингибирующую активность NKG2A" относится к процессу, в котором CD94/NKG2A ингибируется в отношении своей способности отрицательно влиять на внутриклеточные процессы, приводящие к лимфоцитарным ответам, например, высвобождению цитокина и цитотоксическим ответам. Это можно измерить, например, с помощью анализа цитотоксичности на основе NK- или T-клеток, в котором измеряют способность терапевтического соединения стимулировать уничтожение HLA-E-положительных клеток с помощью CD94/NKG2A-положительных лимфоцитов. В одном варианте осуществления получение антитела вызывает по меньшей мере 10% усиления цитотоксичности CD94/NKG2A-ограниченного лимфоцита, предпочтительно по меньшей мере 40% или 50% усиление цитотоксичности лимфоцита или более предпочтительно по меньшей мере 70% усиление цитотоксичности NK, ссылаясь на описанные анализы цитотоксичности. Если антитело к NKG2A снижает или блокирует взаимодействия CD94/NKG2A с HLA-E, это может увеличить цитотоксичность CD94/NKG2A-ограниченных лимфоцитов. Это можно оценить, например, с помощью стандартного 4-х часового анализа цитотоксичности *in vitro* с применением, например, NK-клеток, которые экспрессируют CD94/NKG2A, и клеток-мишеней, которые экспрессируют HLA-E. Эти NK-клетки не способны эффективно уничтожать мишени, которые экспрессируют HLA-E, поскольку CD94/NKG2A распознает HLA-E, что приводит к возникновению и распространению ингибиторной передачи сигналов, которая предотвращает лимфоцит-опосредованный цитолиз. Такой анализ цитотоксичности *in vitro* можно проводить с помощью стандартных способов, которые широко известны в уровне техники, и описаны, например, в Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993). Высвобождение хрома и/или другие параметры для оценки способности антитела стимулировать лимфоциты уничтожать клетки-мишени, такие как клетки P815, K562 или подходящие клетки опухоли, также раскрыты в Sivori et al., J. Exp. Med. 1997;186:1129-1136; Vitale et al., J. Exp. Med. 1998; 187:2065-2072; Pessino et al. J. Exp. Med. 1998;188:953-960; Neri et al. Clin. Diag. Lab. Immun. 2001;8:1131-1135; Pende et al. J. Exp. Med. 1999;190:1505-1516, полное раскрытие каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. Клетки-мишени метили с помощью <sup>51</sup>Cr перед добавлением NK-клеток, а затем уничтожение оценивали пропорционально высвобождению <sup>51</sup>Cr из клеток в среду в результате уничтожения. Добавление антитела, которое предотвращает связывание CD94/NKG2A с HLA-E, приводит к предотвращению возникновения и распространения ингибиторной передачи сигналов посредством CD94/NKG2A. Следовательно, добавление этих средств приводит к повышению лимфоцит-опосредованного уничтожения клеток-мишеней. Тем самым данная стадия определяет средства, которые предотвращают индуцированную CD94/NKG2A отрицательную передачу сигналов посредством, например, блокирования связывания лиганда. В конкретном анализе цитотоксичности высвобождения <sup>51</sup>Cr эффекторные клетки NK, экспрессирующие CD94/NKG2A, могут уничтожать HLA-E-отрицательные клетки-мишени LCL 721.221, но хуже контрольные клетки LCL 721.221-Cw3, экспрессирующие HLA-E. Напротив, эффекторные клетки YTS, в которых отсутствует CD94/NKG2A, эффективно уничтожают обе клеточные линии. Таким образом, эффекторные клетки NK менее эффективно уничтожают HLA-E клетки LCL 721.221-Cw3, вследствие индуцированной HLA-E ингибирующей передачи сигналов посредством CD94/NKG2A. Когда NK-клетки предварительно инкубируют с блокирующими антителами к CD94/NKG2A в соответствии с настоящим изобретением в таком анализе цитотоксичности высвобождения <sup>51</sup>Cr, клетки LCL 721.221-Cw3, экспрессирующие HLA-E, уничтожаются более эффективно зависящим от концентрации антитела образом. Ингибирующую активность (т.е. потенциал повышения цитотоксичности) антитела к NKG2A можно также оценить любым из множества других способов, например, по его влиянию на внутриклеточный свободный кальций, как описано, например, в Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186:1129-1136, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Активацию цитотоксичности NK-клетки можно оценить, например, с помощью измерения повышения продуцирования цитокина (например, продуцирования IFN-γ) или маркеров цитотоксичности (например, мо-



билизации CD107 или CD137). В иллюстративном протоколе продуцирование IFN- $\gamma$  из PBMC оценивают с помощью окрашивания поверхности клетки и внутрицитоплазматического окрашивания и анализа посредством проточной цитометрии после 4 дней в среде для культивирования. Вкратце, брэфельдин А (Sigma Aldrich) добавляют в конечной концентрации 5 мкг/мл в течение последних 4 часов культивирования. Клетки затем инкубируют с mAb к CD3 и к CD56 до пермеабиллизации (IntraPrep™; Beckman Coulter) и окрашивания с помощью PE антитела к IFN- $\gamma$  или PE-IgG1 (Pharmingen). Продуцирование GM-CSF и IFN- $\gamma$  из поликлональных активированных NK-клеток измеряют в супернатантах с применением ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN- $\gamma$ : OptEIA set, Pharmingen).

Всякий раз, когда во всем данном описании "лечение HNSCC" или т.п. упоминается с ссылкой на NKG2A-нейтрализующее средство (например, антитело), имеется в виду: (а) способ лечения HNSCC, при этом указанный способ включает стадию введения (для по меньшей мере одного лечения) средства, нейтрализующего NKG2A, (предпочтительно в материале фармацевтически приемлемого носителя) индивидууму, млекопитающему, в особенности человеку, нуждающемуся в таком лечении, в дозе, которая обеспечивает лечение HNSCC (терапевтически эффективном количестве), предпочтительно в дозе (количестве), указанной в данном документе; (b) применение средства, нейтрализующего NKG2A, для лечения HNSCC или средства, нейтрализующего NKG2A, для применения в указанном лечении (в особенности человека); (c) применение средства, нейтрализующего NKG2A, для изготовления фармацевтического препарата для лечения HNSCC, (d) способ применения средства, нейтрализующего NKG2A, для изготовления фармацевтического препарата для лечения HNSCC, содержащего смешанное средство, нейтрализующее NKG2A с фармацевтически приемлемым носителем или фармацевтического препарата, содержащего эффективную дозу средства, нейтрализующего NKG2A, которое подходит для лечения HNSCC; или (e) любая комбинация из (a), (b), (c) и (d) в соответствии с объектом, допустимым для патентования в стране, где данная заявка подана.

Термин "биопсия", применяемый в данном документе, определяют как удаление ткани с целью исследования, например, для установления диагноза. Примеры типов биопсии включают применение отсасывания, например через иглу, присоединенную к шприцу; инструментальное удаление фрагмента ткани с помощью; удаление с помощью подходящих инструментов посредством эндоскопа; удаление хирургическим путем, например всего очага поражения; и т.п.

Термин "антитело", применяемый в данном документе, относится к поликлональным и моноклональным антителам. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях антитела относят к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из них дополнительно подразделяют на подклассы или изоформы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.п. Иллюстративная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи характеризуется вариабельной областью приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, которая в основном ответственна за распознавание антигена. Термины вариабельная область легкой цепи ( $V_L$ ) и вариабельная область тяжелой цепи ( $V_H$ ) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют "альфа", "дельта", "эпсилон", "гамма" и "мю" соответственно. Хорошо известны структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов. IgG представляет собой иллюстративные классы антител, используемых в данном документе, поскольку они представляют собой наиболее распространенные антитела в физиологическом случае и поскольку их легче всего получить в лабораторных условиях. Необязательно антитело представляет собой моноклональное антитело. Конкретные примеры антител представляют собой гуманизированные, химерные, человеческие или иные подходящие для человека антитела. Термин "антитела" также включает любой фрагмент или производное любого из антител.

Термин "специфически связывается с" означает, что антитело может связываться предпочтительно в анализе конкурентного связывания с партнером по связыванию, например, NKG2A, что оценивается с применением либо рекомбинантных форм белков, их эпитопов или нативных белков, присутствующих на поверхности выделенной клетки-мишени. Анализы конкурентного связывания и другие способы определения специфического связывания широко известны в уровне техники. Например, связывание может быть выявлено с помощью радиоактивных меток, физических способов, таких как масс-спектрометрия или прямых или непрямых флуоресцентных меток, выявляемых с применением, например, цитофлуориметрического анализа (например, FAC Scan). Связывание выше количества, наблюдаемого с контрольным, неспецифическим средством, указывает на то, что средство связывается с мишенью. Средство, которое специфически связывает NKG2A, может связывать NKG2A отдельно или NKG2A в качестве димера с CD94.

Когда указано, что антитело "конкурирует с" конкретным моноклональным антителом, это означает, что антитело конкурирует с моноклональным антителом в анализе связывания с применением либо рекомбинантных молекул (например, NKG2A), либо молекул, экспрессирующихся на поверхности (например, NKG2A). Например, если исследуемое антитело снижает степень связывания антитела, имеюще-

го тяжелую цепь по любому из SEQ ID NO: 2 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7 с полипептидом NKG2A или клеткой, экспрессирующей NKG2A, в анализе связывания, то, соответственно, антитело называют "конкурирующим" соответственно с этим антителом.

Термин "аффинность", применяемый в данном документе, означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела представлена с помощью константы диссоциации  $K_d$ , определяемой как  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ , где  $[Ab-Ag]$  представляет собой молярную концентрацию комплекса антитело-антиген,  $[Ab]$  представляет собой молярную концентрацию несвязанного антитела и  $[Ag]$  представляет собой молярную концентрацию несвязанного антигена. Константу аффинности  $K_a$  определяют как  $1/K_d$ . Способы определения аффинности mAb приведены в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), ссылки на которые включены в данный документ посредством ссылки. Одним стандартным способом, широко известным в уровне техники, для определения аффинности mAb является применение скрининга поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, посредством анализа с помощью аналитического устройства BIAcore™ SPR).

В контексте данного документа "детерминанта" обозначает область взаимодействия или связывания на полипептиде.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте и представляет собой область или участок на антигене с которым связывается антитело. Белковый эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание, а также аминокислотные остатки, который эффективно блокируются с помощью специфического антигенсвязывающего антитела или пептида, т.е. аминокислотные остатки в пределах "области узнавания" антитела. Это простейшая форма или наименьшая структурная область на сложной молекуле антигена, которая может объединяться с, например, антителом или рецептором. Эпитопы могут быть линейными или конформационными/структурными. Термин "линейный эпитоп" определяют как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые смежны с линейной последовательностью аминокислот (первичная структура). Термин "конформационный или структурный эпитоп" определяют как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые не все являются смежными и, таким образом, представляет собой отдельные части линейной последовательности аминокислот, которые оказываются на близком расстоянии по отношению друг к другу в результате укладки молекулы (вторичная, третичная и/или четвертичная структура). Конформационный эпитоп зависит от 3-мерной структуры. Поэтому термин "конформационный", часто применяют взаимозаменяемо с термином "структурный".

Термин "средство" применяют в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов. Термин "терапевтическое средство" относится к средству, которое характеризуется биологической активностью.

В контексте настоящего изобретения "гуманизованное" или "человеческое" антитело относится к антителу, в котором константная и переменная каркасная область одного или нескольких иммуноглобулинов человека слиты с областью связывания, например, CDR иммуноглобулина животного. Эти антитела разработаны для сохранения специфичности связывания антитела, отличного от человеческого, из которого получают области связывания, но для предотвращения иммунной реакции в отношении антитела, отличного от человеческого. Такое антитело может быть получено из трансгенных мышей или других животных, которые были "сконструированы" для получения специфических антител человека в ответ на антигенную стимуляцию (см., например, Green et al. (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856; Taylor et al. (1994) *Int Immun* 6:579, все идеи которых включены в данный документ посредством ссылки). Полностью человеческое антитело также может быть сконструировано при помощи способов генетической или хромосомной трансфекции, а также технологии фагового дисплея, все из которых известны в уровне техники (см., например, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-553). Антитела человека также могут вырабатываться активированными *in vitro* В-клетками (см., например, патенты США №. 5567610 и 5229275, которые включены во всей своей полноте посредством ссылки).

"Химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой (а) константная область или ее части изменены, замещены или заменены, так что антигенсвязывающий участок (переменная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторная функция и/или виды, или совершенно иная молекула, которая обеспечивает новые свойства для химерного антитела, например, фермент, токсин, гормон, фактор роста, лекарственное средство и т.д.; или (b) переменная область ее части, изменены, замещены или заменены переменной областью, имеющей иную или измененную специфичность к антигену.

Термины "Fc-домен", "Fc-часть" и "Fc-область" относятся к C-концевому фрагменту тяжелой цепи антитела, например, от приблизительно 230 (aa) аминокислот до приблизительно 450 aa тяжелой  $\gamma$  (гамма) цепи человека или ее аналогичной последовательности в других типах тяжелых цепей антитела (например,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\mu$  для антитела человека) или встречающимся в природе его аллотипам. Если не указано

иное, во всем настоящем изобретении применяют общепринятую нумерацию аминокислот по Kabat для иммуноглобулинов (см. Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к материалу, который в значительной степени или по сути свободен от компонентов, которые обычно сопровождают его в том виде, в котором он присутствует в своем естественном состоянии. Чистоту и однородность обычно определяют с применением процедур аналитической химии, например, электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, в значительной степени очищен.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимеру из не встречающихся в природе аминокислот.

Термин "рекомбинантный" при применении со ссылкой, например, на клетку или нуклеиновую кислоту, белок или вектор, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы посредством введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или посредством изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в ином случае экспрессируются аномально, недостаточно экспрессируются или не экспрессируются вообще.

В контексте данного документа термин антитело, которое "связывает" полипептид или эпитоп, обозначает антитело, которое связывает указанную детерминанту со специфичностью и/или аффинностью.

Термины "идентичность" или "идентичный", при применении в контексте взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидов, относятся к степени родства последовательности между полипептидами, определенной посредством количества совпадений между нитями двух или более аминокислотных остатков. "Идентичность" измеряет процент идентичных совпадений между меньшей из двух или более последовательностей с выравниванием гэпа (при наличии), рассматриваемого посредством конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е., "алгоритмов"). Идентичность связанных полипептидов может быть легко рассчитана с помощью известных способов. Такие способы включают без ограничения методы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Способы определения идентичности разработаны для обеспечения наибольшего совпадения между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Способы с использованием компьютерной программы для определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX является общедоступной из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NTH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al. выше). Хорошо известный алгоритм Смита-Ватермана может также быть использован для определения идентичности.

#### Получение средств, нейтрализующих NKG2A

Средство, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, может, например, включать средство (например, белок), которое связывает внеклеточную часть рецептора CD94/NKG2A человека или его природный лиганд HLA-E и снижает ингибирующую активность рецептора CD94/NKG2A человека, экспрессированного на поверхности CD94/NKG2A-положительного лимфоцита. В одном варианте осуществления средство конкурирует с HLA-E за связывание с CD94/NKG2A, т.е. средство блокирует взаимодействие между CD94/NKG2A и его лигандом HLA-E. В другом варианте осуществления средство (например, антитело) связывается с CD94/NKG2A и блокирует взаимодействие между CD94/NKG2A и его лигандом HLA-E. В другом варианте осуществления средство, которое нейтрализует ингибирующий рецептор NKG2A, представляет собой белок (например, антитело), который связывается с полипептидом HLA-E человека и ингибирует взаимодействие между белком HLA-E человека и белком CD94/NKG2A человека. В другом варианте осуществления средство не конкурирует с HLA-E за связывание с CD94/NKG2A; т.е. средство связывает NKG2A и способно к связыванию CD94/NKG2A одновременно с HLA-E. Антитело может связывать комбинированный эпитоп на CD94 и NKG2A или эпитоп на NKG2A отдельно. В одном варианте осуществления антитело связывает эпитоп на NKG2A, который по

меньшей мере частично перекрывается участком связывания HLA-E.

В одном аспекте средство, направленное против NKG2A, представляет собой антитело, выбранное из полностью человеческого антитела, гуманизированного антитела и химерного антитела. В одном аспекте средство включает константный домен, полученный из антитела человека IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном аспекте средство представляет собой фрагмент антитела, выбранного из антитела IgA, IgD, IgG, IgE и IgM. В одном аспекте средство представляет собой фрагмент антитела, выбранный из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, Fab'-SH фрагмента, F(Ab)<sub>2</sub>-фрагмента, F(Ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fv-фрагмента, тяжелой цепи Ig (Ig ламы или верблюда), V<sub>HH</sub>-фрагмента, однодоменного FV и однопочечного фрагмента антитела. В одном аспекте средство представляет собой синтетическую или полусинтетическую молекулу, производное от антитела, выбранную из scFV, dsFV, миниантитела, диатела, триотела, тельца каппа, IgNAR; и полиспецифического антитела.

В одном варианте осуществления антитело к NKG2A не демонстрирует существенное специфическое связывание с Fcγ-рецепторами, например, одним или более (или всеми) из CD16, CD32a, CD32b и CD64 человека. Такое антитело может включать константные области различных тяжелых цепей, которые, как известно, не связываются с Fc-рецепторами. Один такой пример представляет собой константную область IgG4. IgG4 в качестве альтернативы, фрагменты антитела, которые не включают константные области, такие как Fab- или F(Ab')<sub>2</sub>-фрагменты, могут использоваться для предотвращения связывания Fc-рецептора. Связывание Fc-рецептора можно оценить в соответствии со способами, известными в уровне техники, включающими, например, испытание связывания антитела с белком Fc-рецептора при помощи анализа BIACORE. Также может быть использован любой тип антитела человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), в котором Fc-часть модифицируют для минимизации или устранения связывания с Fc-рецепторами (см., например, WO 03101485, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки). Анализы, такие как, например, клеточные анализы, для оценки связывания Fc-рецептора широко известны в уровне техники и описаны в, например, WO 03101485.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу или другим средствам связывания с NKG2A. В одном аспекте антитело связывается с NKG2A с KD по меньшей мере в 100 раз ниже, чем с NKG2C и/или NKG2E человека.

В одном аспекте настоящего изобретения средство снижает опосредованное CD94/NKG2A ингибирование лимфоцита, экспрессирующего CD94/NKG2A, посредством вмешательства в передачу сигнала CD94/NKG2A путем, например, вмешательства в связывание HLA-E с помощью NKG2A, предотвращая или индуцируя конформационные изменения рецептора CD94/NKG2A и/или воздействуя на димеризацию и/или кластеризацию рецептора CD94/NKG2A.

В одном аспекте настоящего изобретения средство связывается с внеклеточной частью NKG2A с KD по меньшей мере в 100 раз ниже, чем с NKG2C. В дополнительном предпочтительном аспекте средство связывается с внеклеточной частью NKG2A с KD в по меньшей мере 150, 200, 300, 400, или 10,000-раз ниже, чем с NKG2C. В другом аспекте раскрытия, средство связывается с внеклеточной частью NKG2A с KD в по меньшей мере 100 раз ниже, чем с молекулами NKG2C, NKG2E и/или NKG2H. В дополнительном предпочтительном аспекте средство связывается с внеклеточной частью NKG2A с KD в по меньшей мере 150, 200, 300, 400, или 10000 раз ниже, чем с NKG2C, молекулами NKG2C и/или NKG2H. Это можно измерить, например, в экспериментах BiaCore, в которых способность средств связывать внеклеточную часть иммобилизованного CD94/NKG2A (например, выделенного из клеток, экспрессирующих CD94/NKG2, или полученного в биосистеме) измеряют и сравнивают со связыванием средств с аналогично полученным CD94/NKG2C и/или другими вариантами CD94/NKG2 в том же анализе. В качестве альтернативы связывание средств с клетками, которые либо экспрессируют естественным образом, либо сверхэкспрессируют (например, после временной или стабильной трансфекции), CD94/NKG2A можно измерить и сравнить со связыванием клеток, экспрессирующих CD94/NKG2C и/или другие варианты CD94/NKG2. Антитела к NKG2A могут необязательно связывать NKG2B, который представляет собой вариант сплайсинга NKG2A, образующий ингибиторный рецептор вместе с CD94. В одном варианте осуществления аффинность можно измерить с применением способов, раскрытых в патенте США № 8206709, например путем оценки связывания с ковалентно-иммобилизованным слитым белком NKG2A-CD94-Fc с помощью Biacore, как показано в примере 8 патента США № 8206709, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Антитело может, например, иметь EC<sub>50</sub> для связывания (высокая аффинность) с клетками, экспрессирующими NKG2A, в количестве 0,5-10 нг/мл, необязательно 1-5 нг/мл, необязательно 1-10 нг/мл, необязательно 1-20 нг/мл, например, приблизительно 4 нг/мл. Клетками, экспрессирующими NKG2A, могут быть, например, клетки, экспрессирующие NKG2A в РВМС человека. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие NKG2A представляют собой клетки, полученные для экспрессии CD94/NKG2A, например, клетки Ba/F3, стабильно сверхэкспрессирующие CD94/NKG2A, как показано в примере 13 патента США № 8206709, раскрытие которого включено посредством ссылки. В одном варианте осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания (K<sub>D</sub>), при этом необязательно аффинность связывания двухвалентна, для полипептида NKG2A человека менее 10<sup>-9</sup> М, необязательно менее 10<sup>-10</sup> М или необязательно менее 10<sup>-11</sup> М, необязательно от 10<sup>-10</sup> М до 10<sup>-12</sup> М, необязательно от

$10^{-10}$  М до  $10^{-11}$  М. Можно оценить аффинность, например, для связывания с одноцепочечной конструкцией NKG2A-CD94-mFc, описанной в патенте США № 7932055, раскрытие которого включено посредством ссылки).

Антитело к NKG2A может быть человеческим или гуманизированным антителом, например, содержащим соответствующие области VH и VL антител, показанных в таблице ниже.

Антитело	VH	VL
VH6	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 7
VH1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7
VH5	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7
VH7	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7
VH8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
Z199	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17

Антитело к NKG2A может быть человеческим или гуманизированным антителом, например, содержащим акцепторную каркасную область VH человека из акцепторной последовательности человека, выбранной, например, из VH1\_18, VH5\_a, VH5\_51, VH\_1f и VH1\_46, и JH6 J-сегмента, или других последовательностей каркасной области VH зародышевого типа человека, известного в уровне техники. Акцепторная последовательность области VL человека может быть, например, VKI\_O2/JK4.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело или фрагмент антитела на основе антитела Z270. Разные гуманизированные цепи Z270VH показаны под SEQ ID NO: 2-6 (аминокислоты варибельной области домена подчеркнуты). Гуманизованная легкая цепь Z270VH показана под SEQ ID NO: 7. Антитело HumZ270 также раскрыто в патенте США № 8206709 (раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки). HumZ270VH6 (SEQ ID NO: 3) основан на VH5\_51; HumZ270VH1 (SEQ ID NO: 2) основан на VH1\_18; humZ270VH5 (SEQ ID NO: 4) основан на VH5\_a; humZ270VH7 (SEQ ID NO: 5) основан на VH1\_f; и humZ270VH8 (SEQ ID NO: 6) основан на VH146; все с JH6 J-сегментом. Каждое из этих антител сохраняет высокую аффинность связывания с NKG2A, с низкой вероятностью возникновения иммунного ответа хозяина в отношении антитела, поскольку 6 С-концевых аминокислотных остатка CDR-H2 по Kabat каждой гуманизированной конструкции идентичны акцепторной каркасной области человека. С применением программы для выравнивания VectorNTI получали следующие идентичности последовательности между humZ270VH1 и humZ270VH5, -6, -7 и -8: 78,2% (VH1 по сравнению с VH5), 79,0% (VH1 по сравнению с VH6), 88,7% (VH1 по сравнению с VH7) и 96,0% (VH1 по сравнению с VH8).

В одном аспекте средство включает (i) варибельную область тяжелой цепи под любым из SEQ ID NO: 2-6, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью ей, и (ii) варибельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью ей. В одном аспекте средство включает (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2-6 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью ей и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью ей. Антитело, имеющее тяжелую цепь, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 2-6, и легкой цепью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 7 нейтрализует ингибирующую активность NKG2A, но не связывает непосредственно активирующие рецепторы NKG2C, NKGE или NKG2H. Данное антитело, кроме того, конкурирует с HLA-E за связывание с NKG2A на поверхности клетки. В одном аспекте средство включает последовательности HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, полученные из тяжелой цепи, характеризующейся аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 2-6. В одном аспекте настоящего изобретения средство включает последовательности LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, полученные из легкой цепи, характеризующейся аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 7.

Тяжелые цепи (вариабельные области подчеркнуты).

**VH1.**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDS  
ETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFD  
VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
 PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT  
 VLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  
 QKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 2)

**VH6.**

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSE  
THYSPSFQGOVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARGGYDFDVGTLYWFFDVW  
GQ  
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAV  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
 PCPAPEFLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 FNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK  
 NQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
 VFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSL  
 GK (SEQ ID NO: 3)

**VH5.**

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSE  
THYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARGGYDFDVGTLYWFFDVW  
GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
 PCP  
 APE  
 FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQFN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
EMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF  
SCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 4)

**VH7.**

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGRIDPYDSE  
THY  
AEKFOGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATGGYDFDVGTLYWFFDVWGQ  
GTTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLY  
SLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  
PKPKDT  
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
LHQDW  
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  
QKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 5)

**VH8.**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDS  
ETHY  
AQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQ  
GTTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYS  
LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP  
KPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL  
HQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY

SDIAVIEW

ENSGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)

**Легкая цепь**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPS

RFSGS

GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNYGTPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK

SGTASVVC

LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY

ACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7)

В одном аспекте антитело к NKG2A представляет собой антитело или фрагмент антитела, содержащий CDR-H1, соответствующий остаткам 31-35 под любым из SEQ ID NO: 2-6 (аминокислотная последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 8)), CDR-H2, соответствующий остаткам 50-60 (аминокислотная последовательность RIDPYDSETHY (SEQ ID NO: 9)) (необязательно 50-66, при этом включая 6 концевых аминокислот человеческого происхождения, т.е. последовательность RIDPYDSETHYSPFQG (SEQ ID NO: 10) для тяжелой цепи VH6, последовательность RIDPYDSETHYAQKLQG (SEQ ID NO: 11) для тяжелой цепи VH1 и т.д.) под любым из SEQ ID NO: 2-6, и CDR-H3, соответствующий остаткам 99-114 (95-102 в соответствии с Kabat), под любым из SEQ ID NO: 2-6 (аминокислотная последовательность GGYDFDVGTLTYWFFDV (SEQ ID NO: 12)). В одном варианте осуществления CDR-H2 соответствует остаткам 50-66 под любым из SEQ ID NO: 2-6. Необязательно CDR может содержать одну, две, три, четыре или более аминокислотных замен.

В одном аспекте антитело к NKG2A представляет собой антитело или фрагмент антитела, содержащий CDR-L1, соответствующий остаткам 24-34 под SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 13)), CDR-L2, соответствующий остаткам 50-56 под SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность NAKTLAE (SEQ ID NO: 14)), и CDR-L3, соответствующий остаткам 89-97 под SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность QHNYGTPRT (SEQ ID NO: 15)). Необязательно CDR может содержать одну, две, три, четыре или более аминокислотных замен.

В одном аспекте антитело к NKG2A представляет собой антитело или фрагмент антитела, содержащий CDR-H1, соответствующий остаткам 31-35 под любым из SEQ ID NO: 2-6, CDR-H2, соответствующий остаткам 50-60 (необязательно 50-66) под любым из SEQ ID NO: 2-6, и CDR-H3, соответствующий остаткам 99-114 (95-102 в соответствии с Kabat), под любым из SEQ ID NO: 2-6, CDR-L1, соответствующий остаткам 24-34 под SEQ ID NO: 7, CDR-L2, соответствующий остаткам 50-56 под SEQ ID NO: 7, и CDR-L3, соответствующий остаткам 89-97 под SEQ ID NO: 7.

В одном аспекте средство представляет собой полностью человеческое антитело, которое было направлено против эпитопа CD94/NKG2A, с которым любое из вышеуказанных антител связывается.

Будет понятно, что в то время как вышеуказанные антитела могут использоваться, другие антитела могут быть получены. Например, любой фрагмент NKG2A, предпочтительно, но не исключительно NKG2A человека или любая комбинация фрагментов NKG2A, может использоваться в качестве иммуногенов для выработки антител, и антитела могут распознавать эпитопы в любом положении в полипептиде NKG2A, если они могут сделать это на экспрессирующих NKG2A НК-клетках, как описано в данном документе. Наиболее предпочтительно эпитоп представляет собой эпитоп, специфически распознаваемый антителом, имеющим тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7.

В одном аспекте антитело к NKG2A связывается непосредственно с тем же эпитопом, что и антитело, имеющее тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7, например, моноклонального антитела. Антитело, имеющее тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7, характеризуется потерей связывания с мутантным NKG2A, имеющим следующие аминокислотные замены: K199A/D202A/V213S/R215A/K217A (ссылка на № доступа GenBank AAL65234.1). В одном варианте осуществления антитело к NKG2A, применяемое в соответствии с данным изобретением, связывается с эпитопом NKG2A, который по меньшей мере частично перекрывается или включает по меньшей мере один остаток в эпитопе, связанном посредством антитела, имеющего тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7, например, моноклонального антитела. Можно определить, что остатки, связанные посредством антитела, присутствуют на поверхности полипептида NKG2A, например, в полипептиде NKG2A, экспрессированном на поверхности клетки. Аминокислотные остатки на NKG2A, связанном посредством антитела, могут быть выбраны, например, из группы остатков, состоящей из K199, D202,

V213, R215 и K217 (ссылка на GenBank с № доступа AAL65234.1 или NKG2A аминокислотная по-



следовательность под SEQ ID NO: 1).

Связывание антитела к NKG2A с клетками, трансфицированными с помощью мутантных NKG2A, можно измерить и сравнить со способностью антитела к NKG2A связывать полипептид NKG2A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Снижение связывания антитела к NKG2A и мутантного полипептида NKG2A (например, мутантного NKG2A, имеющего замены K199A/D202A/V213S/R215A/K217A) означает, что присутствует снижение аффинности связывания (например, измеренной с помощью известных способов, таких как исследование FACS клеток, экспрессирующих конкретный мутант, или с помощью исследования связывания ViaSage с мутантными полипептидами) и/или снижение общей способности связывания антитела к NKG2A (например, что подтверждается посредством уменьшения Bmax на графике, изображающем концентрацию антитела к NKG2A по сравнению с концентрацией полипептида). Значительное снижение связывания указывает на то, что мутантный остаток непосредственно вовлечен в связывание с антителом к NKG2A или в непосредственной близости со связывающим белком, когда антитело к NKG2A связывается с NKG2A.

В некоторых вариантах осуществления значительное снижение связывания означает, что аффинность связывания и/или способность связывания между антителом к NKG2A и мутантным полипептидом NKG2A уменьшается на более, чем 40%, более, чем 50%, более, чем 55%, более, чем 60%, более, чем 65%, более, чем 70%, более, чем 75%, более, чем 80%, более, чем 85%, более, чем 90% или более, чем 95% относительно связывания между антителом и полипептидом NKG2A дикого типа. В некоторых вариантах осуществления связывание уменьшается до значений, которые находятся ниже выявляемого предела. В некоторых вариантах осуществления значительное снижение связывания подтверждается, когда связывание антитела к NKG2A с мутантным полипептидом NKG2A составляет менее 50% (например, менее чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10%) связывания, наблюдаемого между антителом к NKG2A и полипептидом NKG2A дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления представлены антитела к NKG2A, которые проявляют в значительной степени более низкое связывание в отношении мутантного полипептида NKG2A, в котором остаток в сегменте, содержащем аминокислотный остаток, связан посредством антитела, имеющего тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7, например монализумаба, замещен другой аминокислотой по сравнению со связыванием с полипептидом дикого типа NKG2A (например полипептидом под SEQ ID NO: 1). В одном варианте осуществления мутант характеризуется заменами K199A, D202A, V213S, R215A и K217A со ссылкой на NKG2A дикого типа под SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте средство включает последовательности HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, полученные из VH, характеризующейся аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16. В одном аспекте настоящего изобретения средство включает последовательности LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, полученные из VL, характеризующейся аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 17. В одном аспекте средство включает последовательности HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, полученные из VH, характеризующейся аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16, и последовательности LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, полученные из VL, характеризующейся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17. Антитело, имеющее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 16 и легкую цепь под SEQ ID NO: 17, нейтрализует ингибирующую активность NKG2A, а также связывает активирующие рецепторы NKG2C, NKGE или NKG2H. Антитело не конкурирует с HLA-E за связывание с NKG2A на поверхности клетки (т.е. оно является неконкурентным антагонистом NKG2A).

EVLVESGGGLV KPGGSLKLSAASGFTFSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEISSGGSYTY

Y

PDTVTGRFTISRDNKNTLYLEISLRSEDTAMYYCTRHG DYPRFFDVWGAGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 16)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSIYIYWYQQKPRSSPKPWIIYLTSLASGVPAR

FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGNPNYTFGGGTKLEIKR

(SEQ ID NO: 17)

В одном аспекте средство содержит аминокислотные остатки 31-35, 50-60, 62, 64, 66 и 99-108 варибельного домена тяжелой цепи (Vh) (SEQ ID NO: 16) и аминокислотные остатки 24-33, 49-55 и 88-96 варибельного домена легкой цепи (Vl) (SEQ ID NO: 17) необязательно с одной, двумя, тремя, четырьмя или более аминокислотными заменами.

В одном аспекте средство представляет собой полностью человеческое антитело, которое было направлено против эпитопа CD94/NKG2A, с которым любое из вышеуказанных антител связывается.

Будет понятно, что в то время как вышеуказанные антитела могут использоваться, другие антитела могут распознавать и вырабатываться против части полипептида NKG2A до тех пор, пока антитело вызывает нейтрализацию ингибирующей активности NKG2A. Например, любой фрагмент NKG2A, пред-

почтительно, но не исключительно NKG2A человека или любая комбинация фрагментов NKG2A, может использоваться в качестве иммуногенов для выработки антител, и антитела могут распознавать эпитопы в любом положении в полипептиде NKG2A, если они могут сделать это на экспрессирующих NKG2A NK-клетках, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления эпитоп представляет собой эпитоп, специфически распознаваемый посредством антитела, имеющего тяжелую цепь под любым из SEQ ID NO: 2-6 и легкую цепь под SEQ ID NO: 7.

В одном аспекте средство конкурирует с антителом humZ270, раскрытым в патенте США № 8206709 (раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки) за связывание с внеклеточной частью рецептора CD94/NKG2A человека. В одном аспекте средство конкурирует с гуманизированным антителом Z199, раскрытым в патенте США № 8 796 427 (раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки) за связывание с внеклеточной частью рецептора CD94/NKG2A человека. Конкурентное связывание может быть измерено, например, с помощью экспериментов ViaCore, в которых измеряют способность средств связывать внеклеточную часть иммобилизованного CD94/NKG2A рецептора (например, выделенного из клеток, экспрессирующих CD94/NKG2, или полученного в биосистеме), насыщенного humZ270. В качестве альтернативы измеряют связывание средств с клетками, которые либо экспрессируют естественным образом, либо сверхэкспрессируют (например, после временной или стабильной трансфекции) рецептор CD94/NKG2A, и которые предварительно инкубировали с насыщающими дозами Z270. В одном варианте осуществления конкурентное связывание можно измерить с применением способов, раскрытых в патенте США № 8206709, например, путем оценки связывания с клетками Va/F3-CD94-NKG2A с помощью проточной цитометрии, как показано в примере 15 патента США № 8206709, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Средство, направленное против NKG2A, такое как антитело, может быть включено в фармацевтический состав, содержащий антитело в концентрации от 1 мг/мл до 500 мг/мл, где указанный состав характеризуется pH от 2,0 до 10,0. Состав может дополнительно включать буферную систему, консервант(консерванты), средство(средства), регулирующее тоничность, хелатирующее средство(средства), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном варианте осуществления фармацевтический состав представляет собой водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Такой состав представляет собой, как правило, раствор или суспензию. В дополнительном варианте осуществления фармацевтический состав представляет собой водный раствор. Термин "водный состав" определяют как состав, содержащий по меньшей мере 50% вес./вес. воды. Аналогично, термин "водный раствор" определяют как раствор, содержащий по меньшей мере 50% вес./вес. воды, и термин "водная суспензия" определяют как суспензию, содержащую по меньшей мере 50% вес./вес. воды.

В другом варианте осуществления фармацевтический состав представляет собой высушенный посредством сублимации состав, куда врач или пациент добавляют растворители и/или разбавители перед применением.

В другом варианте осуществления фармацевтический состав представляет собой высушенный состав (например, высушенный посредством сублимации или высушенный путем распылительной сушки), готовый для применения без какого-либо предварительного растворения.

В дополнительном аспекте фармацевтический состав содержит водный раствор такого антитела и буфер, где антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или выше, и где указанный состав характеризуется pH от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0.

В другом варианте осуществления pH состава находится в диапазоне, выбранном из перечня, состоящего из значений от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0, от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0 и от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5.

В дополнительном варианте осуществления буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицил-глицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, натрия дигидрофосфата, дунатриевого гидрофосфата, фосфата натрия и трис(гидроксиметил)-аминометана, бицина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей. Каждый из этих конкретных буферов представляет альтернативный вариант осуществления.

В дополнительном варианте осуществления состав дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В дополнительном варианте осуществления состав дополнительно содержит изотоническое средство. В дополнительном варианте осуществления состав также содержит хелатирующее средство. В дополнительном варианте осуществления состав дополнительно содержит стабилизатор. В дополнительном варианте осуществления состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Для удобства делается ссылка на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995.

Возможно, что другие ингредиенты могут быть представлены в фармацевтическом составе пептида. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие средства, эмульгаторы, антиоксиданты, объемобразующие средства, модификаторы тоничности, хелатирующие средства, ионы металла, маслосодержащие носители, белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттерион (например, аминокислота, такая как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гисти-

дин). Эти дополнительные ингредиенты, разумеется, не должны отрицательно повлиять на общую стабильность фармацевтического состава.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело, могут быть введены пациенту, нуждающемуся в таком лечении, в несколько областей, например, область местного действия, например, на кожу и слизистую, области с обходом всасывания, например, введение в артерию, в вену, в сердце, и в области, которые подразумевают всасывание, например, введение в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшную полость. Введение фармацевтических композиций может осуществляться несколькими путями введения, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, лингвально, сублингвально, трансбуккально, в рот, перорально, в желудок и кишечник, назально, ингаляционно, например, через бронхиолы и альвеолы или их комбинацию, эпидермально, дермально, трансдермально, вагинально, ректально, глазным путем, например, через конъюнктиву, уретрально и парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении.

Подходящие составы на основе антитела можно также определить путем исследования опыта с другими уже разработанными терапевтическими моноклональными антителами. Для нескольких моноклональных антител показано, что они эффективны при клинических состояниях, например, Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб) Xolair® (омализумаб), Vexxa® (тоситумомаб) и Campath® (алемтузумаб) и подобные составы могут применяться с антителами по настоящему изобретению. Например, моноклональное антитело может поставляться при концентрации 10 мг/мл во флаконах для однократного применения объемом либо 100 мг (10 мл), либо 500 мг (50 мл), составленных для IV введения в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильной воде для инъекций. Значение pH доводят до 6,5. В другом варианте осуществления антитело поставляют в составе, содержащем приблизительно 20 мМ Na-цитрата, приблизительно 150 мМ NaCl, при pH приблизительно 6,0.

#### Лечение HNSCC

Описаны способы, применимые при лечении карцином, в частности рака HNSCC, в частности неоперабельной карциномы или HNSCC, который является устойчивым к цетуксимабу. Цетуксимаб (ERBITUX®) представляет собой антитело к EGFR, которое было одобрено контролирующими органами (FDA) в 2011 для HNSCC.

Устойчивая к цетуксимабу карцинома может прогрессировать (например, не проявляет ответ, рецидивирует, распространяется на другие органы), несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба (и необязательно лучевой терапии или других видов лечения). В некоторых вариантах осуществления индивидуум, чье заболевание раком прогрессировало, мог получать предшествующее лечение с помощью цетуксимаба в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, чье заболевание раком прогрессировало, мог получать предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, объединенного с химиотерапевтическим средством (например, терапия с применением препарата на основе платины), или цетуксимаба, объединенного с лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к предшествующему курсу терапии с помощью цетуксимаба (необязательно дополнительно в комбинации с лучевой терапией, химиотерапией и/или другими средствами) индивидуум получал дополнительный предшествующий курс терапии с помощью химиотерапевтического средства на основе платины, где дополнительный предшествующий курс терапии с помощью средства на основе платины вводят перед курсом терапии с помощью цетуксимаба.

В одном варианте осуществления карцинома является HNSCC. HNSCC представляет собой плоскоклеточную или базалоидную опухоль, которая возникает в области головы или шеи, и включает опухоли носовой полости, носоглотки, пазух, губ, рта и ротовой полости, слюнных желез, глотки, гипоглотки или гортани. Виды лечения, раскрытые в настоящем документе, могут быть, в частности, применимы, например, при лечении опухолей ротоглотки, опухолей гортани, опухолей ротовой полости и опухолей гипоглотки. Эти опухоли регулярно выявляются практикующими врачами в области онкологии, например, врачами, химиотерапевтами, патогистологами и отоларингологами, и хирургами головы и шеи. Необязательно HNSCC представляет собой нематастатический HNSCC.

В любых вариантах осуществления в данном документе, если контекст не указывает иное, рак головы и шеи (например, HNSCC) необязательно может быть определен как местно рецидивирующий, отдаленно метастатический и/или может считаться неизлечимым (и любая их комбинация, такая как, например, местно рецидивирующий, местно рецидивирующий и отдаленно метастатический, местно рецидивирующий и не отдаленно метастатический, возможно, кроме того, в любом из вышеуказанных случаев считается неизлечимым).

В одном иллюстративном аспекте представлен способ прекращения, обращения или снижения прогрессирования HNSCC у млекопитающего-хозяина (например, пациента-человека), страдающего неоперабельным раком HNSCC, и у которого заболевание или рак прогрессировал несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба отдельно или цетуксимаба, объединенного с химиотерапией или с лучевой терапией, при этом способ включает введение пациенту средства, направленного против NKG2A (например, антитела к NKG2A), композиции антитела к NKG2A или соответствующей композиции (на-

пример, нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к NKG2A) в количестве, достаточном для выявляемого снижения прогрессирования HNSCC у хозяина.

В другом аспекте представлен способ предотвращения прогрессирования HNSCC до метастатического рака у млекопитающего-хозяина (например, пациента-человека), страдающего неоперабельным неметастатическим раком, при этом необязательно дополнительно рак прогрессировал, несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, при этом способ включает введение пациенту средства, направленного против NKG2A.

В любом варианте осуществления в данном документе заболевание, рак или HNSCC, который прогрессирует, несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, может относиться к заболеванию, раку или HNSCC, устойчивым к цетуксимабу. Индивидуума, который страдает раком или HNSCC, который прогрессирует, несмотря на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, можно называть индивидуумом, который является (или чье заболевание, рак или HNSCC является) устойчивым к цетуксимабу.

В одном варианте осуществления средство, направленное против NKG2A, вводят в комбинации с цетуксимабом. Рак, который является устойчивым или, например, прогрессировал, можно необязательно охарактеризовать как опухоль, устойчивую к лечению с помощью цетуксимаба, а не, например, новую первичную опухоль. Устойчивая к цетуксимабу опухоль может, например, возникнуть в той же области и во время курса лечения с помощью цетуксимаба или в ограниченный период после окончания лечения с помощью цетуксимаба (например, 1, 2 или 3 года или меньше, например 3, 4, 6, 9 месяцев).

В одном варианте осуществления представлены композиции для применения при лечении заболевания, например рака, устойчивого к цетуксимабу. В некоторых вариантах осуществления представлено средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и/или цетуксимаб для применения в лечении HNSCC индивидуума, у которого рак HNSCC устойчив к лечению (например, предшествующему лечению) с помощью цетуксимаба (например, отдельно цетуксимабом или в комбинации с другим средством, таким как химиотерапия или лучевая терапия). В одном варианте осуществления представлено средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, для применения в лечении HNSCC у индивидуума-человека, получавшего предшествующее лечение с помощью цетуксимаба, при этом лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (б) цетуксимаба. В одном варианте осуществления рак или карцинома представляет собой HNSCC.

В одном варианте осуществления представлен цетуксимаб для применения в лечении HNSCC у индивидуума, получавшего предшествующее лечение (например, первый курс лечения с помощью цетуксимаба), где указанное лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека и (б) цетуксимаба (например, второй курс лечения с помощью цетуксимаба). Таким образом, индивидуума, который получал первый, предшествующий курс лечения с помощью цетуксимаба, и чье заболевание прогрессировало во время или после такого первого курса лечения с помощью цетуксимаба, можно лечить с помощью второго курса лечения с помощью цетуксимаба, в котором цетуксимаб применяют в комбинации со средством, необязательно антителом, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека. Таким образом, индивидуум, который получал первый предшествующий курс лечения с помощью цетуксимаба можно лечить с помощью эффективного количества каждого из: (а) средства, необязательно антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека и (б) цетуксимаба (второй курс лечения с помощью цетуксимаба).

В одном аспекте применение цетуксимаба и/или средства, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A, обуславливает уменьшение опухолевой нагрузки, необязательно обуславливает уменьшение суммы диаметров очагов поражения клетки-мишени по сравнению с исходной суммой диаметров. В одном варианте осуществления применение цетуксимаба и/или средства, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A, предназначено для замедления прогрессирования рака. В одном варианте осуществления применение цетуксимаба и/или средства, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A, предназначено для замедления или предотвращения метастазирования при раке.

Подходящие протоколы лечения для лечения индивидуума включают, например, введение индивидууму эффективного количества антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, при этом способ включает по меньшей мере один цикл введения, в котором по меньшей мере одну дозу антитела к NKG2A вводят в дозе 1-10 мг/кг веса тела. В одном варианте осуществления цикл введения составляет от 2 недель до 8 недель.

В одном варианте осуществления способ включает по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период из восьми недель или меньше, при этом для каждого по меньшей мере одного цикла две, три или четыре дозы антитела к NKG2A вводят в дозе 1-10 мг/кг веса тела.

В одном варианте осуществления средство, направленное против NKG2A, вводят в количестве, эффективным для насыщения рецепторов NKG2A на лимфоцитах в течение по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель. В некоторых вариантах осуществления дозу (например,

каждую дозу) антитела к NKG2A вводят в количестве, составляющем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг.

В одном аспекте по любому варианту осуществления в данном документе антитело к NKG2A вводят один раз приблизительно каждые две или четыре недели.

Доставка антитела к NKG2A индивидууму (либо посредством прямого введения, либо экспрессии из нуклеиновой кислоты в нем, например, из вектора переноса вирусного гена оспы, содержащего последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело к NKG2A), и применение других способов в данном документе может использоваться для снижения, лечения, предотвращения или иного уменьшения интенсивности любого подходящего аспекта прогрессирования рака (в частности, прогрессирования HNSCC). Раскрытые в данном документе способы могут быть, в частности, применимы при снижении и/или уменьшении интенсивности роста опухоли, количества клеток опухоли и любого параметра или симптома, связанного с ним (например, биомаркеров). Раскрытые в данном документе способы могут быть, в частности, применимы при предотвращении рецидива опухоли, увеличении продолжительности выживаемости без прогрессирования, предотвращении метастазирования. Способы, которые снижают, предотвращают или иным образом ослабляют тяжесть таких аспектов прогрессирования рака, независимо и совместно, являются преимущественными элементами.

В другом аспекте представлен способ снижения риска прогрессирования рака, снижения риска дальнейшего прогрессирования рака в популяции клеток, которую подвергли стимулированию, и/или обеспечения терапевтического режима для снижения прогрессирования рака у пациента-человека. В дополнительном аспекте представлен способ повышения вероятности выживания в течение соответствующего периода у пациента-человека, у которого диагностировали HNSCC. В другом аспекте представлен способ улучшения качества жизни пациентов, страдающих HNSCC, включающий введение пациенту композиции в количестве, эффективном для улучшения качества их жизни. В дополнительном аспекте способы, описанные в данном документе, можно применять для значительного уменьшения размера опухоли или опухолевой нагрузки. В дополнительном аспекте способы, описанные в данном документе, можно применять для значительного снижения количества клеток HNSCC у позвоночного животного-хозяина, так, чтобы, например, общее число клеток HNSCC уменьшалось. В связи с этим представлен способ уничтожения (например, прямого или косвенного обеспечения гибели) клеток HNSCC у позвоночного, такого как больной раком человек.

Как правило, прогрессирование рака и ответные реакции могут быть определены исследователем в соответствии со стандартными соглашениями о критериях ответа опухоли, например, в соответствии с "Критериями оценки ответа на солидные опухоли" (RECIST) v1.1, как подробно описано в Eisenhauer, EA, et al, New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (версия 1.1), Eur J Cancer 2009;45:228-247, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Раскрытое в данном документе средство, нейтрализующее NKG2A (например, антитело к NKG2A), можно использовать для лечения индивидуума в комбинации с цетуксимабом. Следовательно, при прогрессировании HNSCC во время или после предшествующего курса на основе цетуксимаба (предшествующий курс цетуксимаба не включает комбинированное лечение средством, нейтрализующим NKG2A) индивидуума (например, страдающего неоперабельным необязательно неметастатическим раком) можно лечить с помощью комбинации средства, нейтрализующего NKG2A, и цетуксимаба. Предшествующий курс цетуксимаба может включать одно или несколько дополнительных средств или видов терапии, в частности, лучевую терапию и/или химиотерапию.

В некоторых случаях перед предшествующим курсом цетуксимаба (либо в качестве монотерапии, либо необязательно в комбинации с лучевой терапией и/или химиотерапией) индивидуум будет получать еще более ранний курс лечения химиотерапевтическим средством на основе платины; например, индивидуум получал курс лечения препаратом на основе платины с последующим курсом лечения цетуксимабом. В данных условиях индивидуум мог перенести прогрессирование рака, несмотря на лечение средством на основе платины, а затем получал последующее лечение цетуксимабом (предшествующий курс цетуксимаба), при этом цетуксимаб необязательно вводили в сочетании с лучевой терапией и/или химиотерапевтическим средством. Если индивидуум затем переносит прогрессирование рака, несмотря на лечение с помощью предшествующего курса цетуксимаба, индивидуума можно лечить с помощью комбинации средства, нейтрализующего NKG2A и цетуксимаба.

Комбинированное введение средства, нейтрализующего NKG2A, и цетуксимаба включает одновременное введение соединения в идентичных или различных лекарственных формах или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, средство, нейтрализующее NKG2A, и цетуксимаб могут быть определены, как составленные для раздельного введения и вводимые одновременно или последовательно. Лечение необязательно может быть объединено с введением одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В одном варианте осуществления курс лечения с помощью средства, нейтрализующего NKG2A, включает средство, нейтрализующее NKG2A, и цетуксимаб без других терапевтических (например, противораковых) средств. В другом варианте осуществления курс лечения с помощью средства, нейтрализующего NKG2A, включает средство, нейтрализующее NKG2A, цетуксимаб и еще одно дополнительное терапевтическое (например, противораковое)

средство.

Дополнительное или комбинированное введение средства, направленного против NKG2A, и цетуксимаба, как используется в данном документе, включает одновременное введение соединений в идентичных или различных лекарственных формах, или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, средство, направленное против NKG2A, и цетуксимаб можно вводить одновременно в одном составе. В качестве альтернативы средство, направленное против NKG2A, и цетуксимаб могут быть составлены для раздельного введения и вводятся одновременно или последовательно.

В способах лечения антитело к NKG2A и цетуксимаб можно вводить раздельно, вместе или последовательно, или в смеси. В некоторых вариантах осуществления цетуксимаб вводят перед введением антитела к NKG2A. Например, антитело к NKG2A можно вводить за от приблизительно 0 до 30 дней до введения цетуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2A вводят за от приблизительно 30 минут до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 минут до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 часа до приблизительно 2 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 4 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 6 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 8 часов, от приблизительно 8 часов до 1 дня, или от приблизительно 1 до 5 дней до введения цетуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2A вводят одновременно с введением цетуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2A вводят после введения цетуксимаба. Например, антитело к NKG2A можно вводить через от приблизительно 0 до 30 дней после введения цетуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKG2A вводят через от приблизительно от 30 минут до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 минут до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 часа до приблизительно 2 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 4 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 6 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 8 часов, от приблизительно 8 часов до 1 дня или от приблизительно 1 до 5 дней после введения цетуксимаба.

Подходящие протоколы лечения для лечения человека, страдающего HNSCC, включают, например, введение пациенту эффективного количества каждого антитела, которое нейтрализует активность NKG2A, и цетуксимаба, при этом способ включает по меньшей мере один цикл введения, в котором по меньшей мере одну дозу антитела к NKG2A вводят в дозе, составляющей 1-10 мг/кг веса тела (например каждые две недели), и вводят по меньшей мере одну дозу, необязательно по меньшей мере две дозы цетуксимаба, необязательно при этом цетуксимаб вводят в дозе, составляющей 250 мг/м<sup>2</sup>, еженедельно, необязательно при этом цетуксимаб вводят в дозе, составляющей 400 мг/м<sup>2</sup>, в качестве начальной дозы, с последующей по меньшей мере одной дозой, составляющей 250 мг/м<sup>2</sup> еженедельно. В любом варианте осуществления в данном документе каждую дозу антитела к NKG2A можно вводить в фиксированной дозе, например, фиксированной дозе, составляющей от 100 до 1000 мг, необязательно от 200 до 1200 мг, например, 750 мг.

В одном варианте осуществления способ включает по меньшей мере один период введения (например, цикл введения), где цикл или период составляет восемь недель (или меньше), при этом для каждого по меньшей мере из одного периода две, три или четыре дозы антитела к NKG2A вводят в дозе, составляющей 1-10 мг/кг веса тела (например, фиксированная доза, составляющая от 100-1000 мг, необязательно от 200-1200 мг, например, 750 мг). В одном варианте осуществления каждый цикл дополнительно включает введение двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или восьми доз цетуксимаба в дозе, составляющей 250 мг/м<sup>2</sup>. Необязательно цикл включает нагрузочную дозу цетуксимаба; т.е. первая доза в цикле включает введение одной начальной дозы цетуксимаба в дозе, составляющей 400 мг/м<sup>2</sup>, и последующей дозы цетуксимаба в дозе, составляющей 250 мг/м<sup>2</sup>.

Антитело к NKG2A можно преимущественно вводить в количестве, которое достигает концентрации в кровотоке, являющейся по меньшей мере в 10, 20 или 30 раз выше, чем концентрация, необходимая для практически полного (например, 90%, 95%) насыщения рецептора (например, по оценке титрования антител к NKG2A на клетках, экспрессирующих NKG2A, например, в РВМС), или необязательно в количестве, которое достигает концентрации в экстраваскулярной ткани (например, опухолевой ткани или окружающей среде), которая по меньшей мере в 10, 20 или в 30 раз выше, чем концентрация, необходимая для практически полного насыщения рецептора (например, по оценке титрования антител к NKG2A на клетках, экспрессирующих NKG2A, например, в РВМС).

Ответ NKG2A+ НК-клеток можно оценить с помощью подходящего анализа цитотоксической активности НК-клеток, экспрессирующих NKG2A, в отношении экспрессирующих HLA-E клеток-мишеней. Примеры включают анализы на основе маркеров активации НК-клетки, например, экспрессии CD107 или CD137. Преимущественно количество антитела к NKG2A можно вводить таким образом, чтобы достичь и/или поддерживать постоянную (минимальную) концентрацию в ткани, составляющую по меньшей мере 10 мкг/мл. Например, концентрация в крови, которую необходимо достичь и/или поддерживать для достижения/поддержания 10 мкг/мл в ткани, может составлять 100-110 мкг/мл, 100-120 мкг/мл, 100-130 мкг/мл, 100-140 мкг/мл, 100-150 мкг/мл, 100-200 мкг/мл, 100-250 мкг/мл или 100-300 мкг/мл.

Иллюстративные протоколы лечения для антитела к NKG2A, такого как humZ270 (например, моноклонализумаб), используемого в примерах в данном документе, характеризующегося  $EC_{100}$  для ответа NKG2A+ NK-клетки 1-10 мкг/мл, например, приблизительно 10 мкг/мл, включают по меньшей мере один цикл введения, в котором по меньшей мере одну дозу антитела к NKG2A вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг, необязательно 2-10 мг/кг, необязательно 4-10 мг/кг, необязательно 6-10 мг/кг, необязательно 2-6 мг/кг, необязательно 2-8 мг/кг или необязательно 2-4 мг/кг веса тела, необязательно фиксированной дозе, составляющей от 100 до 1000 мг, необязательно от 200 до 1200 мг, например, 750 мг. Вводят необязательно по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз антитела к NKG2A. В одном варианте осуществления цикл введения составляет от 2 недель до 8 недель. В одном варианте осуществления цикл введения составляет 8 недель. В одном варианте осуществления цикл введения составляет 8 недель и включает введение одной дозы антитела к NKG2A каждые две недели (т.е. всего четыре дозы).

В одном аспекте по любому из вариантов осуществления в данном документе антитело к NKG2A вводят один раз приблизительно каждые две недели.

Иллюстративные протоколы лечения для использования с антителом к NKG2A включают, например, введение пациенту антитела к NKG2A два раза в месяц и количество, эффективное для поддержания постоянной концентрации в крови антитела к NKG2A, составляющей по меньшей мере 40 мкг/мл, между по меньшей мере двумя последующими введениями антитела к NKG2A составляет от 2 до 10 мг/кг, необязательно 2-6 мг/кг, необязательно 2-4 мг/кг, необязательно приблизительно 4 мг/кг веса тела или необязательно фиксированную дозу в диапазоне 100-1000 мг, необязательно в диапазоне 200-1200 мг, например, 750 мг. Такие дозы можно необязательно вводить таким образом, чтобы обеспечить в крови постоянную концентрацию антитела к NKG2A, составляющую по меньшей мере 40 мкг/мл на протяжении всего цикла лечения. Ожидается, что достижение концентрации в крови антитела к NKG2A, составляющей 40 мкг/мл, обеспечит концентрацию в ткани (например, экстраваккулярной ткани, в опухолевой среде), составляющую приблизительно 4 мкг/мл, обеспечивая по крайней мере  $EC_{50}$  для антитела, такого как гуманизированное Z270 (например, моноклонализумаб).

Иллюстративные протоколы лечения для использования с антителом к NKG2A включают, например, введение пациенту эффективного количества антитела к NKG2A, где антитело вводят 2 раза в месяц, и количества, эффективного для поддержания постоянной концентрации в крови антитела к NKG2A, составляющей по меньшей мере 100 мкг/мл между по меньшей мере двумя последующими введениями антитела к NKG2A, составляет от 4-10 мг/кг, необязательно 4-6 мг/кг, необязательно 4-8 мг/кг, необязательно приблизительно 4 мг/кг, необязательно приблизительно 6 мг/кг, необязательно приблизительно 8 мг/кг, необязательно приблизительно 10 мг/кг веса тела, или необязательно фиксированной дозы в диапазоне, составляющем 100-1000 мг, необязательно в диапазоне, составляющем 200-1200 мг, например, 750 мг. Такие дозы можно необязательно вводить таким образом, чтобы обеспечить постоянную концентрацию в крови антитела к NKG2A, составляющую по меньшей мере 100 мкг/мл на протяжении всего цикла лечения. Ожидается, что достижение концентрации в крови антитела к NKG2A, составляющей 100 мкг/мл, обеспечит концентрацию в ткани (например, экстраваккулярной ткани, в опухолевой среде), составляющую приблизительно 10 мкг/мл, что, в свою очередь, соответствует по меньшей мере  $EC_{100}$  для антитела, такого как гуманизированное Z270.

Пациента, страдающего раком головы и шеи, прогрессирующим или не реагирующим в достаточной степени на предшествующее лечение с помощью цетуксимаба или после него, можно лечить с помощью средства, нейтрализующего NKG2A, без предшествующей стадии обнаружения для оценки экспрессии HLA-E на поверхности опухолевых клеток. Таким образом, необязательно способы лечения могут включать стадию обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида HLA-E в биологическом образце опухоли (например, на клетке опухоли) от индивидуума. Определение того, что биологический образец экспрессирует HLA-E (например, экспрессирует HLA-E на детектируемом уровне, экспрессирует HLA-E, по крайней мере, на заранее определенном уровне, в значительной степени экспрессирует HLA-E, экспрессирует HLA-E на высоком уровне или с высокой интенсивностью окрашивания антителом к HLA-E, в каждом случае необязательно по сравнению с эталоном) можно использовать для обозначения пациента как страдающего раком головы и шеи, который может получить особенно сильную пользу от лечения средством, которое нейтрализует активность NKG2A. В одном варианте осуществления способ включает определение уровня экспрессии нуклеиновой кислоты или полипептида HLA-E в биологическом образце и сравнение уровня с эталонным уровнем (например, значением, интенсивным окрашиванием поверхности клетки и т.д.), соответствующим индивидууму, который получает пользу от лечения средством, которое ингибирует, нейтрализует активность NKG2A. Определение того, что биологический образец экспрессирует нуклеиновую кислоту или полипептид HLA-E на уровне, который соответствует и/или повышается до эталонного уровня, указывает на то, что у индивидуума, который может получить особенно сильную пользу от лечения с помощью средства, которое ингибирует, нейтрализует активность NKG2A, есть рак головы и шеи. Необязательно обнаружение полипептида HLA-E в биологическом образце включает обнаружение полипептида HLA-E, экспрессированного на поверхности злокачественной клетки HNSCC. В одном варианте осуществления определение того, что биологический образец в значительной степени экспрессирует нуклеиновую кислоту или полипептид HLA-E, указывает на

то, что индивидуум, который может получить особенно сильную пользу от лечения средством, нейтрализующим активность NKG2A, страдает раком головы и шеи. "Экспрессируемый в значительной степени" в отношении полипептида HLA-E означает, что полипептид HLA-E экспрессируется в значительном количестве опухолевых клеток, взятых у данного пациента. Хотя определение термина "экспрессируемый в значительной степени" не ограничивается точным процентным значением, в некоторых примерах рецептор, который считается "экспрессируемым в значительной степени", будет присутствовать по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80% или более клеток HNSCC, взятых у пациента.

Определение того, есть ли у индивидуума раковые клетки головы и шеи, которые экспрессируют полипептид HLA-E, может, например, включать получение биологического образца (например, путем проведения биопсии) от человека, который имеет раковые клетки головы и шеи, приведение указанных клеток в контакт с антителом, которое связывает полипептид HLA-E, и определение того, экспрессируют ли клетки HLA-E на своей поверхности. Необязательно определение наличия у индивидуума раковых клеток головы и шеи, экспрессирующих HLA-E, включает проведение иммуногистохимического анализа. Необязательно определение наличия у индивидуума раковых клеток головы и шеи, экспрессирующих HLA-E, включает проведение анализа с помощью проточной цитометрии.

Пациента, страдающего раком головы и шеи, в частности HNSCC, можно, кроме того, лечить с помощью средств, направленных против NKG2A, с или без предварительной стадии обнаружения для оценки того, является ли пациент (или опухоль пациента) HPV-положительным. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение способами по настоящему изобретению, является HPV-положительным. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение способами по настоящему изобретению, является HPV-отрицательным.

### Примеры

Пример 1. Случай ответного лечения HNSCC повторными инъекциями монализумаба в комбинации с цетуксимабом у пациента, устойчивого к цетуксимабу.

Фазу A 1b/2 исследования в отношении IPH2201 и цетуксимаба проводили на пациентах с вирусом папилломы человека (HPV) (+) и HPV (-), страдающих плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Несмотря на то, что цетуксимаб одобрен для лечения HNSCC после терапии с применением препарата на основе платины, он характеризуется ограниченной активностью в этих условиях (частота ответа 12%). В клиническом исследовании оценивали эффективность лечения HNSCC с использованием монализумаба в комбинации с цетуксимабом. Монализумаб (см. WHO Drug Information Vol. 30, № 1, 2016), также называемый IPH2201, представляет собой нейтрализующее антитело к NKG2A, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную под SEQ ID NO: 2, и аминокислотную последовательность легкой цепи, показанную под SEQ ID NO: 7.

Критерии включения были следующими.

Возраст  $\geq 18$  лет.

1. Гистологически или цитологически подтвержденный статус HPV (+) или HPV (-) плоскоклеточной карциномы носоглотки (тип 1 по классификации WHO), ротоглотки, гипофаринкса, гортани (надгортанника, голосовой щели, подголосовой полости) или полости рта.

2. Рецидивирующее или метастатическое заболевание, подтвержденное визуализацией (компьютерная томография, МРТ, рентген) и/или физическим обследованием. В фазе II требуется показатель поддающегося измерению заболевания в соответствии с критериями оценки ответа на солидные опухоли [RECIST] 1.1. В фазе Ib допускаются пациенты с поддающимся измерению заболеванием или без него.

3. Прогрессирование после проведения химиотерапии с применением препарата на основе платины.

4. Только для фазы Ib: Пациенты, прошедшие предварительное лечение, и не подлежащие дальнейшей терапии с целью излечения. Эта часть открыта для пациентов, прошедших предварительное лечение, независимо от количества предшествующих линий лечения.

Только для фазы II: пациенты, которые ранее получали не более двух системных схем лечения рецидива и/или метастатического заболевания и не поддаются дальнейшей терапии с целью излечения.

5. Отсутствие предшествующего лечения цетуксимабом, за исключением случаев, когда он назначен для первичного лечения (местнораспространенное заболевание) при отсутствии прогрессирования заболевания в течение по меньшей мере 4 месяцев после окончания предшествующего лечения цетуксимабом.

6. Восстановление после предшествующей операции и восстановление после побочных эффектов до степени 1 или менее (кроме алопеции) вследствие предшествующей лучевой терапии и любой системной терапии.

7. Индекс общего состояния согласно восточной объединенной онкологической группе (ECOG) составляет 0-1.

8. Ожидаемая продолжительность жизни  $\geq 3$  месяцев.

9. Пациенты с подвергавшимися лечению метастазами в головной мозг имеют право на участие, если прошло  $>4$  недель после завершения терапии (включая лучевую терапию и/или хирургическое вмешательство), если они являются клинически стабильными на момент включения в исследование и не получают терапию кортикостероидными средствами на момент включения в исследование.



10. Надлежащая гематологическая, иммунологическая функция, функция печени и почек, определяемая как

гемоглобин  $\geq 9,0$  г/дл;

абсолютное число нейтрофилов  $\geq 1500/\text{мм}^3$ ;

тромбоциты  $\geq 100000/\text{мм}^3$ ;

общий билирубин  $\leq 1,5$  X установленная верхняя граница нормы (UNL);

аспартатаминотрансфераза (AST) и аланинаминотрансфераза (ALT)  $\leq 2,5$  X;

установленная UNL, уровень креатинина в сыворотке крови  $\leq 1,5$  X установленная UNL или расчетная (по формуле Кокрофта-Голта) или измеренный клиренс креатинина  $\geq 50$  мл/мин.

11. Отрицательный результат теста на беременность сыворотки крови в течение 72 ч до начала исследуемого лечения для женщин с репродуктивным потенциалом. Женщины с репродуктивным потенциалом и все мужчины должны дать согласие на использование надлежащей контрацепции (гормональный или барьерный способ предупреждения беременности; воздержание) до включения в исследование, на время приема монализумаба и в течение 5 месяцев после последней дозы монализумаба.

12. Способность понимать письменный документ информированного согласия.

13. Подписанное информированное согласие перед любыми процедурами, относящимися к протоколу.

Критерии исключения были следующими.

1. Только для фазы II: пациенты, которые ранее получали более 2 системных схем лечения рецидивирующего и/или метастатического заболевания (без ограничений в части исследования фазы Ib).

2. Только для фазы II: пациенты, получавшие цетуксимаб или другой ингибитор рецептора эпидермального фактора роста, исключаются из фазы II исследования, за исключением случаев, когда цетуксимаб был назначен в рамках первичного подхода к лечению при отсутствии прогрессирования заболевания в течение как минимум 4 месяцев после окончания предшествующего лечения цетуксимабом.

3. Наличие в анамнезе аллергических реакций, связанных с соединениями, аналогичными по химическому или биологическому составу цетуксимабу.

4. Исключаются пациенты с известными, не подвергавшимися лечению и неконтролируемыми метастазами в головной мозг. Однако исследования головного мозга не требуются для отбора, если у пациента отсутствуют неврологические признаки или симптомы.

5. Серьезное сопутствующее неконтролируемое медицинское расстройство.

6. Аутоиммунное заболевание, которое:

1) в настоящее время или ранее требовало системной иммуносупрессивной или иммуномодулирующей терапии (включая кортикостероиды, вводимые системно), и/или

2) имеет значительную вероятность причинить необратимое повреждение любой ткани, и/или

3) было диагностировано менее чем за 3 месяца до включения в исследование, и/или

4) клинически нестабильно, и/или

5) характеризуется существенным риском прогрессировать и вызвать серьезные осложнения.

7. Аномальный сердечный статус с любым из следующего.

1) Нестабильная стенокардия.

2) Аритмия, требующая лечения, которая не стабилизируется лечением.

3)  $QTc > 450$  мс (M) или  $470$  мс (F) (формула Базетта - интервал  $QT/\sqrt{RR}$  (интервал RR), где интервал  $RR = 60/\text{HR}$ ).

8. Наличие в анамнезе сердечной дисфункции, включая любое из следующего.

1) Инфаркт миокарда в течение последних 6 месяцев.

2) Задokumentированная застойная сердечная недостаточность в анамнезе (III-IV стадии согласно руководству Функциональная классификация Нью-Йоркской ассоциации кардиологов).

9. Известное интерстициальное заболевание легких.

10. Беременные женщины исключены из этого исследования; грудное вскармливание необходимо прекратить.

11. Другие активные инвазивные злокачественные новообразования (за исключением подвергавшейся лечению базальноклеточной или плоскоклеточной карциномы кожи или карциномы шейки матки in situ).

12. Лечение другими исследуемыми средствами менее чем за 14 дней до включения в исследование.

13. Системное лечение стероидами или другими иммунодепрессантами в течение 30 дней до включения в исследование. Допускается физиологическая замена гидрокортизоном или его эквивалентом.

14. Текущее активное инфекционное заболевание.

15. Положительная серология в отношении ВИЧ.

16. Положительный HBs-Ag или положительная виремия HBV, Положительная виремия HCV.

17. Психологические, семейные, социологические или географические условия, которые не позволяют проводить медицинское наблюдение и соблюдение протокола исследования.

Испытание включало часть повышения дозы, в которой пациенты получали увеличивающиеся уровни дозы монализумаба, составляющие 0,4, 1, 2, 4 или 10 мг/кг, каждые две недели в комбинации с

фиксированными дозами цетуксимаба (нагрузочная доза 400 мг/м<sup>2</sup>, а затем 250 мг/м<sup>2</sup> еженедельно) по схеме 3+3. В части расширения когорты использовали монализумаб в самой высокой испытанной дозе, составляющей 10 мг/кг, и включали анализ нецелесообразности после первых 11 пациентов. Частоту ответа оценивали согласно RECIST каждые 8 недель. Пациенты получали лечение до прогрессирования рака или до неприемлемой токсичности. Испытания продолжаются с целью включения дополнительных пациентов и оценки продолжительности ответа, отсутствия прогрессирования и общей выживаемости.

Среди наблюдаемых начальных частичных ответов был пациент, имеющий в анамнезе плоскоклеточную карциному правого альвеолярного отростка нижней челюсти, стадия T4aN2bM0/IVA, которому была проведена хирургическая резекция с правой задней латеральной мандибулэктомией с реконструкцией свободного лоскута малоберцовой кости с последующим адьювантным облучением. У пациента была рецидивирующая плоскоклеточная карцинома полости рта (которая не является новым первичным раком), p16-отрицательная, которая была неоперабельной. Пациент ранее получал 3 цикла индукции цисплатин-таксотер-5-FU (TRF) (замена цисплатина карбоплатином) с последующей одновременной химиолучевой терапией с еженедельным лечением цетуксимабом. Примерно через 4 месяца после завершения курса цетуксимаба с помощью PET/CT у пациента выявили рецидив рака. Пациент был признан устойчивым к цетуксимабу, так как рецидив наблюдался чуть более чем через 4 месяца после завершения курса цетуксимаба плюс радикальная лучевая терапия, рецидив рака полости рта появился в течение трех лет (и, таким образом, не считался новым первичным раком) и находился в той же области, в данном случае все на правой стороне. Пациента рекомендовали для фазы 1b/2 исследования IPH2201 и цетуксимаба. Лечение с помощью монализумаба и цетуксимаба в соответствии с протоколом привело к объективному ответу (PR), с лучшим ответом, составляющим 50% уменьшением целевых очагов поражения при лечении по сравнению с исходным уровнем (до лечения). Показатель поражения представляет собой сумму самых длинных диаметров или самых коротких осей в случае лимфатических узлов.

Также среди наблюдаемого начального частичного ответа был пациент с плоскоклеточной карциномой ротоглотки, правосторонней латеральностью, стадии TхN2bMMVA. Предшествующие курсы лечения пациента включали химиотерапию (цисплатин/доцетаксел/5FU) на начальной стадии заболевания с последующей лучевой терапией. При прогрессирующем заболевании пациента лечили от рецидивирующего/метастатического заболевания с помощью хирургического вмешательства в исходной области и лимфатических узлах с последующей химиотерапией (цисплатин/карбоплатин/SFU), затем цетуксимабом. У пациента выявили прогрессирующее заболевание (как наилучший ответ) после лечения цетуксимабом, после чего пациенту вводили паклитаксел и карбоплатин. По мере прогрессирования заболевания пациента включали в фазу 1b/2 исследования IPH2201 и цетуксимаба. Лечение с помощью монализумаба и цетуксимаба в соответствии с протоколом привело к ответу (PR).

Обнаружение того, что нейтрализующее антитело к NKG2A в сочетании с цетуксимабом может обеспечить значительное уменьшение интенсивности HNSCC у пациентов, которые были признаны устойчивыми к цетуксимабу, предоставляет возможность для значительной популяции пациентов с HNSCC, которые имеют неоперабельный рак и у которых рак прогрессирует, несмотря на лечение цетуксимабом, особенно в сочетании с лучевой терапией. Лечение может являться полезным для предотвращения дальнейшего прогрессирования, в особенности для отсрочки или предотвращения метастатического рака.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и в той же степени, как если бы каждый документ был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе (в максимальной степени, разрешенной законом), независимо от любого отдельно предусмотренного включения определенных документов, сделанного в другом месте настоящего документа.

Использование терминов в единственном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения должны толковаться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

Если не указано иное, все точные значения, представленные в данном документе, являются иллюстративными для соответствующих приблизительных значений (например, все точные иллюстративные значения, предоставленные по отношению к конкретному фактору или измерению, могут также рассматриваться как обеспечивающие соответствующее приблизительное измерение, измененное на "приблизительно", где необходимо). Если "приблизительно" используется в связи с числом, это может быть указано как включающее значения, соответствующие  $\pm 10\%$  от указанного числа.

Описание в данном документе любого аспекта или варианта осуществления изобретения с использованием таких терминов, как "содержащий", "имеющий", "включающий" или "вмещающий" со ссылкой на элемент или элементы, предназначено для поддержки аналогичного аспекта или варианта реализации изобретения, который "состоит из", "состоит по существу из" или "по существу включает" этот конкретный элемент или элементы, если иное не указано или явно не противоречит контексту (например, композиция, описанная в данном документе как содержащая конкретный элемент, должна пониматься также как описание композиции, состоящей из этого элемента, если иное не указано или явно не противоречит

контексту).

Применение всех возможных примеров или иллюстративных фраз (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, а не для формулирования ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакая фраза в настоящем описании не должна толковаться как указание, что какой-либо незаъявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, в лечении рака у индивидуума, являющегося человеком с неоперабельным HNSCC, где антитело представляет собой антитело к NKG2A, содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющей последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющей последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, при этом лечение включает введение индивидууму эффективного количества каждого из: (а) антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (b) цетуксимаба,

где индивидуум страдает раком HNSCC, который прогрессирует, несмотря на предшествующее лечение цетуксимабом в комбинации с лучевой терапией.

2. Применение по п.1, где лечение HNSCC у индивидуума включает

а) определение того, страдает ли индивидуум HNSCC, который является устойчивым к цетуксимабу, и  
 б) после определения того, что индивидуум страдает HNSCC, который является устойчивым к цетуксимабу, введение индивидууму (i) антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и (ii) цетуксимаба.

3. Применение по любому из пп.1, 2, где лечение HNSCC у индивидуума включает

а) определение того, экспрессируется ли полипептид HLA-E злокачественными клетками индивидуума, страдающего HNSCC, и

б) после определения того, что злокачественные клетки экспрессируют полипептид HLA-E, введение индивидууму (i) антитела, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, и ii) цетуксимаба.

4. Применение по п.3, где определение того, экспрессируется ли полипептид HLA-E злокачественными клетками, включает получение от индивидуума биологического образца, который содержит клетки HNSCC, приведение указанных клеток в контакт с антителом, которое связывает полипептид HLA-E, и выявление клеток, которые экспрессируют HLA-E.

5. Применение по любому из пп.1-4, где антитело к NKG2A характеризуется снижением связывания с мутантным полипептидом NKG2A, имеющим замены K199A/D202A/V213S/R215A/K217A (со ссылкой на SEQ ID NO: 1), по сравнению с полипептидом NKG2A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

6. Применение по любому из пп.1-5, где антитело к NKG2A содержит константную область IgG4 человека.

7. Применение по любому из пп.1-6, где антитело к NKG2A содержит Fc-сконструированную константную область, содержащую аминокислотную модификацию, которая снижает связывание с рецептором Fcγ человека.

8. Применение по любому из пп.1-7, где антитело к NKG2A конкурирует с антителами, имеющими тяжелую и легкую цепи, содержащие SEQ ID NO: 2 и 7 соответственно, за связывание с NKG2A человека.

9. Применение по любому из пп.1-8, где антитело к NKG2A содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7.

10. Применение по любому из пп.1-9, где антитело к NKG2A вводят в виде фармацевтически приемлемой композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела к NKG2A.

11. Применение по п.10, где композиция не содержит каких-либо других фармацевтически активных средств.

12. Применение по любому из пп.1-11, где антитело к NKG2A вводят несколько раз с частотой введения доз от одного раза каждую неделю до одного раза каждый месяц.

13. Применение по любому из пп.1-12, где цетуксимаб вводят еженедельно.

14. Применение по любому из пп.1-13, где лечение включает по меньшей мере один цикл введения, при этом средство, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, вводится каждые две недели, а цетуксимаб вводится еженедельно.

15. Применение по любому из пп.1-14, где лечение включает по меньшей мере один период продолжительностью две недели, где для каждого по меньшей мере из одного периода антитело, которое нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, вводят в дозе, составляющей 1-10 мг/кг веса тела, а цетуксимаб вводят в начальной дозе, составляющей 400 мг/м<sup>2</sup>, а затем еженедельно по 250 мг/м<sup>2</sup>.

16. Применение по любому из пп.1-15, где лечение включает по меньшей мере один период продолжительностью две недели, где для каждого по меньшей мере из одного периода антитело, которое

нейтрализует ингибирующую активность NKG2A человека, вводится в фиксированной дозе, составляющей от 100 до 1000 мг, необязательно 750 мг, а цетуксимаб вводится в начальной дозе, составляющей 400 мг/м<sup>2</sup>, а затем еженедельно по 250 мг/м<sup>2</sup>.

