

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393420 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.13

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.31

---

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ NKG2A И КОМПОЗИЦИИ

---

(31) 63/195,470

(32) 2021.06.01

(33) US

(86) PCT/EP2022/064703

(87) WO 2022/253805 2022.12.08

(71) Заявитель:  
ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ (FR)

(72) Изобретатель:

Хансен Ранди Вест, Уленброк  
Франциска Катарина, Дитрих  
Николай, Ворсоэ Анне, Грандаль  
Микаэль Монрад (DK)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к антителам против NKG2A и способам их применения для повышения иммунитета у нуждающегося в этом пациента и для лечения рака.

---

A1

202393420

202393420

A1

## АНТИТЕЛА ПРОТИВ NKG2A И КОМПОЗИЦИИ

## 5 ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США 63/195.470, поданной 1 июня 2021 г. Раскрытие этой приоритетной заявки полностью включено посредством ссылки.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 **[0002]** Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Электронная копия Списка последовательностей, созданная 30 мая 2022 г., называется 022675\_WO065\_SL.txt и имеет размер 43564 байта.

## 15 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** Белки NKG2 представляют собой лектиновые рецепторы С-типа, которые димеризуются с CD94 на поверхности клетки. NKG2A является ингибирующим членом семейства и экспрессируется на естественных клетках-киллерах (NK) и подмножестве CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Взаимодействие гетеродимера NKG2A/CD94 с неклассической молекулой МНС класса I HLA-E вызывает фосфорилирование иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIM) в цитоплазматическом хвосте NKG2A, что приводит к передаче ингибирующего сигнала и последующему ингибированию активации NK-клеток и Т-клеток.

25 **[0004]** HLA-E экспрессируется на клетках многих солидных опухолей и гематологических раковых заболеваний. Путем сверхэкспрессирования HLA-E, раковые клетки могут усиливать трансдукцию ингибирующего сигнала комплексом NKG2A/CD94/HLA-E и, таким образом, получать защиту от цитотоксической активности NK-клеток и Т-клеток, что приводит к худшим  
30 результатам лечения пациентов.

**[0005]** Учитывая роль NKG2A в развитии рака, существует потребность в новых и улучшенных противораковых способах лечения, нацеленных на NKG2A.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** Настоящее изобретение относится к антителам против NKG2A, которые могут усиливать активацию NK-клеток и Т-клеток. Антитела можно использовать для стимуляции иммунного ответа пациента, нуждающегося в этом, например, пациента, страдающего раком или иммунодефицитом. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько из этих антител, и применение антител и фармацевтических композиций для лечения рака. Антитела и композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способе лечения рака у пациента; могут быть использованы для изготовления лекарственного средства для лечения рака у пациента; или могут быть использованы для лечения рака у пациента. По сравнению с доступными в настоящее время способами лечения таких видов рака, включая лечение антителами, предполагается, что антитела и композиции, описанные в настоящем документе, могут обеспечить превосходный клинический ответ либо сами по себе, либо в комбинации с другим противораковым средством.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, которое конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом человеческого NKG2A, что и антитело 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть определяются аминокислотными последовательностями шести CDR, переменными доменами тяжелой и легкой цепи или тяжелыми и легкими цепями указанного антитела.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в котором

- a) тяжелая цепь указанного антитела включает:
  - i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, соответственно;
  - ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;  
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61; и

5 б) легкая цепь указанного антитела включает:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно;

10 ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;  
или

15 iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела включает:

20 i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15-17, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

25 iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;  
или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела включает:

30 i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;  
или

iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела включает:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела включает:

i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в которой

а) тяжелая цепь указанного антитела включает:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-37, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела включает:

5 i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

10 iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в котором

15 а) тяжелая цепь указанного антитела включает:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

20 iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела включает:

25 i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-50, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

30 iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела включает:

5        i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55-57, соответственно;

      ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

      iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;

10        или

      iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61; и

      б) легкая цепь указанного антитела включает:

15        i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-60, соответственно;

      ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

      iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

      или

20        iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

**[0014]** Настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеотидные последовательности, которые кодируют тяжелую цепь или её

25        антигенсвязывающую часть, легкую цепь или её антигенсвязывающую часть,

      или обе, антитела против NKG2A или антигенсвязывающую часть, описанные в

      настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам

      получения антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, описанных

      в настоящем документе, путем культивирования указанных клеток-хозяев, а

30        также к способам получения композиции антител путем смешивания антител

      или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе.

**[0015]** Другие особенности, цели и преимущества данного изобретения очевидны из последующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание, хотя и указывает варианты осуществления и аспекты

изобретения, дано только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из подробного описания.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

5 [0016] На **ФИГ. 1** представлен набор графиков, показывающий профили связывания шести антител против NKG2A человека, эталонного антитела и контрольного антитела с NKG2A и NKG2C человека и яванского макака, экспрессированных на временно трансфицированных клетках CHO-S. Связывание антител измеряли с помощью проточной цитометрии (MFI: средняя  
10 интенсивность флуоресценции).

[0017] На **ФИГ. 2** представлен набор графиков, показывающий способность шести антител против NKG2A человека, эталонного антитела и контрольного антитела блокировать связывание HLA-E с клетками CHO-S, временно трансфицированными NKG2A человека (Панель А), NKG2A яванского  
15 макака (Панель В), NKG2C человека (Панель С) или NKG2C яванского макака (Панель D).

[0018] На **ФИГ. 3** показана кристаллическая структура человеческого NKG2A/CD94 в комплексе с HLA-E/ $\beta$ 2m (PDB: 3CDG). HLA-E/ $\beta$ 2m и CD94 показаны в виде лент. NKG2A показан как поверхностное изображение.  
20 Ключевые остатки эпитопа связывания для некоторых антител против NKG2A человека (как обсуждается в примере б) выделены черным цветом в виде палочек.

[0019] На **ФИГ. 4** представлен набор графиков, показывающий связывание шести антител против NKG2A человека, эталонного антитела и  
25 контрольного антитела с внеклеточными доменами (ECD) NKG2A человека с одиночными или тройными аминокислотными заменами в остатке(ах) в соответствующем(их) положении(ях) человеческого NKG2C. MFI: средняя интенсивность флуоресценции; имитация: ложно-трансфицированные клетки (клетки с имитированной трансфекцией).

30 [0020] На **ФИГ. 5** представлен набор графиков, показывающий лизис клеток K562-HLA-E, опосредованный либо клетками NK92 (Панель А), либо первичными НК-клетками (Панель В), после инкубации с панелью антител против NKG2A человека. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, n=3. Корреляция данных, представленных на Панелях А и В, показана на Панели С.



Пунктирные линии обозначают уровни лизиса в образцах, не обработанных антителами («необработанные») или обработанных аналогом моноклонального антитела.

5 [0021] На **ФИГ. 6** представлена пара графиков, показывающих лизис клеток K562-HLA-E, опосредованный клетками NK-2, после инкубации с указанными mAb против NKG2A, эталонным антителом, контрольным антителом IgG<sub>4</sub> («ctrl») и контрольным антителом IgG<sub>1</sub>-LALA. Данные нормализованы к необработанному контролю на Панели А.

10 [0022] На **ФИГ. 7** представлена пара графиков, показывающих лизис клеток K562-HLA-E, опосредованный первичными NK-клетками, после инкубации с указанными mAb против NKG2A, эталонным антителом, контрольным антителом IgG<sub>4</sub> («ctrl») и контрольным антителом IgG<sub>1</sub>-LALA. Данные нормализованы к необработанному контролю.

15 [0023] На **ФИГ. 8** представлен график, показывающий лизис клеток K562-HLA-E, опосредованный  $\gamma\delta$  Т-клетками, после инкубации с указанными антителами против NKG2A, эталонным антителом и контрольным антителом («ctrl»). Данные нормализованы к необработанному контролю.

20 [0024] На **ФИГ. 9** представлена пара графиков, показывающих EC<sub>50</sub> (вверху) и эффективность (внизу) уничтожения раковых клеток K562-HLA-E, опосредованного первичными NK-клетками человека, после инкубации с указанными антителами против NKG2A. Значения EC<sub>50</sub>, а также данные об эффективности были извлечены из анализов уничтожения NK-клеток и суммированы для сравнения.

25 [0025] На **ФИГ. 10** представлена пара графиков, показывающих экспрессию эндогенных HLA-E на поверхности шести различных линий опухолевых клеток (Панель А) и влияние антитела 24208 на NK-опосредованное уничтожение этих шести линий опухолевых клеток (Панель В).

30 [0026] На **ФИГ. 11** представлена пара графиков, показывающих концентрацию MIP-1 $\beta$  при совместном культивировании тримерных клеток HLA-E A549 (вверху) или тримерных клеток HLA-E JIMT-1 (внизу) с первичными NK-клетками человека, обработанными антителом 24208 или IgG<sub>1</sub> LALA.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0027] Настоящее изобретение относится к новым антагонистическим антителам против NKG2A человека, которые можно использовать для ингибирования активности NKG2A у пациента, такого как больной раком. Если

не указано иное, используемый здесь термин «NKG2A» относится к NKG2A человека. Полипептидная последовательность NKG2A человека доступна под регистрационным номером UniProt № P26715 (NKG2A\_HUMAN) (SEQ ID NO: 63), как показано ниже:

```

5           10           20           30           40           50
MDNQGVIIYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ
           60           70           80           90           100
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR
           110          120          130          140          150
10 HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK
           160          170          180          190          200
NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD
           210          220          230
SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYNCK HKL

```

15

**[0028]** Термин «антитело» (Ab) или «иммуноглобулин» (Ig), используемый в настоящем документе, относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи (около 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (около 25 кДа), соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Домены VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые «определяющими комплементарность областями» (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» (FR). Каждый VH и VL состоят из трех CDR (H-CDR здесь обозначает CDR тяжелой цепи; а L-CDR здесь обозначает CDR легкой цепи) и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Присваивание номеров аминокислот, а также областей FR и CDR в тяжелой или легкой цепи может соответствовать определениям IMGT® (европейская нумерация; Lefranc et al., *Dev Comp Immunol* **27(1)**:55-77 (2003)); или определениям по Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* **196**: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* **342**: 878-

883 (1989); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* **262**: 732-745 (1996); или Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.* **309**(3):657-70 (2001).

**[0029]** Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое экспрессируется из клетки или клеточной линии, содержащей нуклеотидную(ые) последовательность(и), кодирующую(ие) антитело, причем указанная(ые) нуклеотидная(ые) последовательность(и) не связана(ы) естественным образом с клеткой.

**[0030]** Термин «изолированный белок», «изолированный полипептид» или «изолированное антитело» относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника происхождения (1) не связаны с естественно связанными компонентами, которые сопровождают его в его нативном состоянии, (2) не содержит других белков того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида и/или (4) не встречается в природе. Таким образом, полипептид, который синтезируется химически или синтезируется в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он естественным образом происходит, будет «изолирован» от своих естественно связанных с ним компонентов. Белок также можно сделать практически свободным от естественно связанных компонентов путем выделения с использованием способов очистки белка, хорошо известных в данной области.

**[0031]** Термин «аффинность» относится к мере притяжения между антигеном и антителом. Внутренняя аттрактивность антитела к антигену обычно выражается как константа равновесия аффинности связывания ( $K_D$ ) конкретного взаимодействия антитело-антиген. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда  $K_D$  связывания составляет  $\leq 1$  мкМ, например,  $\leq 100$  нМ или  $\leq 10$  нМ. Константу аффинности связывания  $K_D$  можно измерить, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) с использованием системы IBIS MX96 SPR от IBIS Technologies или платформы Catterra LSA SPR, или с помощью биослойной интерферометрии, например, с использованием системы Octet™ от ForteBio.

**[0032]** Термин «эпитоп», используемый в данном описании, относится к части (детерминанте) антигена, которая специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифическая связывающая молекула. Эпитопические детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи

углеводов или сахаров, и обычно имеют определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные характеристики заряда. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия возникают между аминокислотными остатками белка, которые отделены друг от друга первичной аминокислотной последовательностью. После определения желаемого эпитопа на антигене, можно генерировать антитела к этому эпитопу с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, антитело к линейному эпитопу можно получить, например, путем иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу можно получить, например, путем иммунизации животного мини-доменом, содержащим соответствующие аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к конкретному эпитопу также можно получить, например, путем иммунизации животного интересующей молекулой-мишенью (например, NKG2A) или ее соответствующей частью с последующим скринингом на связывание с эпитопом.

**[0033]** Можно определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и антитело против NKG2A настоящего изобретения, или конкурирует за связывание с ним, используя способы, известные в данной области техники, включая, помимо прочего, конкурентные анализы, связывание эпитопов и аланиновое сканирование. В некоторых вариантах осуществления антителу против NKG2A по настоящему изобретению позволяют связываться с NKG2A в условиях насыщения, а затем измеряют способность тестируемого антитела связываться с NKG2A. Если тестируемое антитело способно связываться с NKG2A одновременно с эталонным антителом против NKG2A, то тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело против NKG2A. Однако, если тестируемое антитело не способно одновременно связываться с NKG2A, тогда тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связываемого антителом против NKG2A настоящего раскрытия. Этот эксперимент можно провести, например, с

использованием ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Чтобы проверить, конкурирует ли антитело против NKG2A с другим антителом против NKG2A, можно использовать способ конкуренции, описанный выше, в двух направлениях, т.е. определение того, блокирует ли известное антитело тестируемое антитело и наоборот. Такие эксперименты по перекрестной конкуренции можно проводить, например, с использованием прибора IBIS MX96 или Catterra LSA SPR или системы Octet™.

**[0034]** Термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором последовательности переменного домена и константной области получены из человеческих последовательностей. Термин охватывает антитела с последовательностями, полученными из генов человека, но модифицированными, например, для снижения иммуногенности, повышения аффинности и/или повышения стабильности. Кроме того, этот термин охватывает антитела, полученные рекомбинантным путем в клетках, не являющихся человеческими, которые могут приводить к гликозилированию, не типичному для клеток человека. Этот термин также охватывает антитела, продуцируемые в трансгенных организмах, не являющихся человеческими, с генами человеческих антител (например, крысы OmniRat®).

**[0035]** Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «часть антитела»), используемый в настоящем документе, относится к одной или нескольким частям или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческим NKG2A или его частью). Было показано, что определенные фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть», включают (i) Fab-фрагмент: моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>: двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb, который состоит из домена VH; и (vi) изолированную определяющую комплементарность область (CDR), способную специфически связываться с антигеном. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить рекомбинантными

методами с помощью синтетического линкера, который позволяет создать из них единую белковую цепь, в которой VL и VH домены соединяются парами, образуя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv)).

5 Также в рамках настоящего изобретения присутствуют антигенсвязывающие молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH молекула может также содержать одну или несколько областей CH1, шарнира, CH2 или CH3.

Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антигенсвязывающая часть» антитела. Также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой  
10 двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короток, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, тем самым вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих  
15 сайта.

**[0036]** Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub>, могут быть получены из цельных антител с использованием обычных методов, таких как расщепление целых антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезина могут быть получены с  
20 использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в настоящем документе.

**[0037]** Класс (изотип) и подкласс антител против NKG2A можно определить любым способом, известным в данной области. В общем, класс и подкласс антитела можно определить с использованием антител, специфичных  
25 для конкретного класса и подкласса антитела. Такие антитела коммерчески доступны. Класс и подкласс можно определить с помощью ELISA или вестерн-блоттинга, а также других способов. Альтернативно, класс и подкласс могут быть определены путем секвенирования всех или части константных областей тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотных  
30 последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов, и определения класса и подкласса антител.

**[0038]** Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков антитела, упомянутые в настоящем описании, соответствуют схеме нумерации IMGT® (европейская нумерация).

*Антитела против NKG2A*

5 **[0039]** Настоящее изобретение относится к антителам, направленным против NKG2A, и их антигенсвязывающим частям. В конкретном аспекте антитела, раскрытые в настоящем документе, представляют собой антитела человека, полученные от трансгенных животных (например, крыс), которые способны продуцировать антитела, кодируемые реаранжированными генами антител человека. В некоторых вариантах осуществления человеческие антитела могут содержать определенные мутации, например, для замены мутаций, полученных от праймера, обратно на последовательность зародышевой линии (см., например, варианты последовательности, «скорректированные с помощью Symplex» в Таблице 1).

15 **[0040]** В некоторых вариантах осуществления, антитела против NKG2A по настоящему изобретению имеют мутации «LALA» (L234A/L235A) в области Fc. Эти мутации препятствуют связыванию антител с человеческим FcγR (гамма-рецепторами Fc). Такие антитела имеют преимущество, поскольку они имеют низкий уровень вторичных эффекторных функций и, следовательно, не истощают эффекторные Т-клетки и не нацелены на другие незлокачественные клетки.

20 **[0041]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть конкурируют или перекрестно конкурируют за связывание с NKG2A человека с тем же эпитопом NKG2A человека или связываются с тем же эпитопом NKG2A человека, что и антитело, содержащее:

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

г) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

д) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

е) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

10 **[0042]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47 или 57.

15 **[0043]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 тяжелой цепи (H-CDR1-3), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, 15-17, 25-27, 35-37, 45-47 или 55-57, соответственно.

20 **[0044]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53.

25 **[0045]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53.

30 **[0046]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A имеет VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53; и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.



**[0047]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

5 **[0048]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50 или 60.

10 **[0049]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 легкой цепи (L-CDR1-3), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, 18-20, 28-30, 38-40, 48-50 или 58-60, соответственно.

15 **[0050]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть имеет VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54.

20 **[0052]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A имеет VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54; и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62.

30 **[0053]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A содержит VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

**[0054]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A содержит любую из описанных выше тяжелых цепей и любую из описанных выше легких цепей.

**[0055]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 5-10, соответственно;
- 5 б) SEQ ID NO: 15-20, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 25-30, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 35-40, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 45-50, соответственно; или
- е) SEQ ID NO: 55-60, соответственно.

10 **[0056]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит VH и VL, которые являются на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными (например, 90% идентичными) аминокислотным последовательностям:

- 15 а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или
- 20 е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

**[0057]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- 25 б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или
- е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

30 **[0058]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A настоящего раскрытия содержит:

- а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

5 в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

10 д) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

е) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

**[0059]** Настоящее изобретение также относится к антителу против NKG2A или его антигенсвязывающей части, которое конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с тем же эпитопом, или связывается с ним, что и антитело 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135.

20 **[0060]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности антитела 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135.

25 **[0061]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит VH и VL, которые являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными аминокислотной последовательности VH и VL, соответственно, антитела 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135.

30 **[0062]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего раскрытия содержит VH и VL, которые представляют собой VH и VL, соответственно, антитела 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135.

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A настоящего раскрытия представляет собой антитело 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 или 24135, или антитело с такими же аминокислотными последовательностями, что и указанное антитело.

5 **[0064]** Класс антитела против NKG2A, полученного способами, описанными в настоящем документе, может быть переключен или заменен другим классом или подклассом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области  
10 техники, так что она не включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CL или CH, соответственно. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VL или VH, затем оперативно связывают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH, соответственно, из другого класса молекулы иммуноглобулина. Этого можно достичь, используя вектор или  
15 молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность CL или CH, как описано выше. Например, антитело против NKG2A, которое изначально представляло собой IgM, может быть заменено на IgG. Кроме того, переключение классов можно использовать для преобразования одного подкласса IgG в другой, например, из IgG<sub>1</sub> в IgG<sub>2</sub>. Константная область κ-легкой  
20 цепи может быть заменена, например, на константную область λ-легкой цепи или наоборот. Типичный способ получения антитела по настоящему изобретению с желаемым изотипом Ig включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против NKG2A, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против  
25 NKG2A. , получение переменного домена тяжелой цепи, лигирование кодирующей последовательности переменного домена тяжелой цепи с кодирующей последовательностью константной области тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессию легкой цепи и тяжелой цепи, кодируемой лигировали последовательность в клетке и собирали антитело против NKG2A  
30 желаемого изотипа. Константная область κ-легкой цепи может быть заменена, например, на константную область λ-легкой цепи или наоборот. Типичный способ получения антитела по настоящему изобретению с желаемым изотипом Ig включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против NKG2A, и молекулы нуклеиновой кислоты,

5 кодирующей легкую цепь антитела против NKG2A, получения переменного домена тяжелой цепи, лигирования кодирующей последовательности переменного домена тяжелой цепи с кодирующей последовательностью константной области тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессии легкой цепи и тяжелой цепи, кодируемой лигированной последовательностью в клетке и  
собираания антитела против NKG2A желаемого изотипа.

10 **[0065]** Антитело против NKG2A по настоящему изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но обычно оно относится к изотипу IgG, например, к подклассу IgG IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> или IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипическому подклассу IgG<sub>1</sub>.

15 **[0066]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A может содержать по меньшей мере одну мутацию в области Fc. Известен ряд различных мутаций Fc, изменяющих эффекторную функцию антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A  
содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая снижает эффекторную функцию, например, мутации в одном или более из положений 228, 233, 234 и 235, где положения аминокислот пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT<sup>®</sup>.

20 **[0067]** В некоторых вариантах осуществления, например, если антитело относится к подклассу IgG<sub>1</sub>, один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 могут быть мутированы, например, с Leu на Ala (L234A/L235A). Эти мутации снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG<sub>1</sub>. Положения аминокислот пронумерованы согласно схеме  
25 нумерации IMGT<sup>®</sup>.

**[0068]** В некоторых вариантах осуществления, например, если антитело относится к подклассу IgG<sub>4</sub>, оно может содержать мутацию S228P, где положение аминокислот пронумеровано в соответствии со схемой нумерации IMGT<sup>®</sup>. Известно, что эта мутация уменьшает нежелательный обмен плеча Fab.

30 **[0069]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего изобретения является антагонистическим.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть связывается с NKG2A человека с K<sub>D</sub> 15, 10, 7, 5,

4, 3, 2 или 1 нМ или менее, как измерено методом поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть связывается с NKG2A человека с  $K_D$ , которая по меньшей мере в 40, 30, 20, 10 или 5 раз меньше, чем  $K_D$ , с которой оно связывается с NKG2C человека.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть специфически не связывается или связывается очень слабо с NKG2C человека, NKG2A яванского макака, NKG2C яванского макака или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть специфически связывается с NKG2C человека, NKG2A яванского макака, NKG2C яванского макака или любой их комбинацией.

**[0072]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть связывается с NKG2A человека, экспрессируемым на клетках CHO-S, например, в концентрации 30 мкг/мл, 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 500 нг/мл, 250 нг /мл, 100, 50 нг/мл, 25 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл, 1 нг/мл или 0,5 нг/мл или менее.

**[0073]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть блокирует связывание HLA-E с гетеродимером NKG2A/CD94 человека, экспрессируемым на клетках CHO-S, например, в концентрации 10 мкг/мл, 3 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 40 нг/мл, 14 нг/мл или менее.

**[0074]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает опосредованное клетками NK-92 уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E, например, в концентрации 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,1 мкг/мл, 1,7 мкг/мл, 0,85 мкг/мл или 0,41 мкг/мл или меньше. В некоторых вариантах реализации, например, при одной из указанных концентраций уничтожение усиливается на 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500% или более по сравнению с необработанными клетками. В конкретных вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает опосредованное клетками NK-92 уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E, более эффективно, чем моноклональный.

**[0075]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает первичное опосредованное NK-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E, например, в концентрации 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,1 мкг/мл, 1,7 мкг/мл, 0,85 мкг/мл или 0,41 мкг/мл или менее. В некоторых вариантах осуществления, например, при одной из указанных концентраций уничтожение усиливается на 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500% или более по сравнению с необработанными клетками. В конкретных вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает опосредованное первичными NK-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E, более эффективно, чем моноклональный антитело BMS-NKG2A.9, и/или BMS-NKG2A.11.

**[0076]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает опосредованное  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E, например, в концентрации 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,1 мкг/мл, 1,7 мкг/мл, 0,85 мкг/мл или 0,41 мкг/мл или менее. В некоторых вариантах осуществления, например, при одной из указанных концентраций уничтожение усиливается на 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500% или более по сравнению с необработанными клетками. В конкретных вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть усиливает опосредованное  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E, более эффективно, чем моноклональный антитело.

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления, связывание антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части с NKG2A человека зависит от остатка S170 (необязательно в комбинации с S167 и/или I168) или остатка E197 NKG2A человека.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом NKG2A человека, содержащим аминокислотный остаток S170. В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно содержит аминокислотные остатки S167 и I168. В некоторых вариантах осуществления эпитоп (который может содержать аминокислотные остатки S167, I168 и/или S170) не содержит аминокислотные остатки E179 и/или M189.

**[0079]** Настоящее изобретение также рассматривает антитело против NKG2A или антигенсвязывающую часть с любой комбинацией вышеуказанных свойств.

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления, антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, обладают по меньшей мере одним (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или всеми 9) из следующих свойств:

- а) связывается с NKG2A человека с  $K_D$  15 нМ или менее, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса;
- б) связывается с NKG2A человека, экспрессируемым на клетках CHO-S;
- в) блокирует связывание HLA-E с гетеродимером человеческий NKG2A/CD94, экспрессируемым на клетках CHO-S;
- г) усиливает опосредованное клетками NK-92 уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E;
- д) усиливает опосредованное первичными NK-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных с HLA-E;
- е) усиливает опосредованное  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E;
- ж) связывается с другим эпитопом на NKG2A человека, чем монализумаб;
- з) усиливает первичное опосредованное NK-клетками уничтожение клеток HT-29, CCRF-CEM, A253, Detroit 562, CAL-120 и/или FaDu; и
- и) индуцирует секрецию MIP-1 $\beta$ .

Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут обладать свойствами а)-е), а)-д), а)-ж), а)-и) или а)-д) и ж).

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут усиливать активность NK-клеток и/или Т-клеток у пациента.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут ингибировать рост опухоли и/или вызывать регрессию роста опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут замедлять



или обращать вспять метастазирование у онкологического пациента. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут продлевать выживаемость онкологического пациента. Также рассматривается любая комбинация вышеуказанных свойств.

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению может быть частью более крупной молекулы иммуноадгезина, образованной путем ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или его части с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезина включают использование области стрептавидинового ядра для создания тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для создания двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают случаи, когда одна или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из антитела встраиваются в молекулу ковалентно или нековалентно, чтобы сделать ее иммуноадгезином, который специфически связывается с представляющим интерес антигеном. В таких вариантах осуществления одна или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) могут быть включены как часть более крупной полипептидной цепи, могут быть ковалентно связаны с другой полипептидной цепью или могут быть включены нековалентно.

**[0084]** В другом аспекте можно получить слитое антитело или иммуноадгезин, который содержит все или часть антитела против NKG2A по настоящему изобретению, связанного с другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления с полипептидом связаны только переменные домены антитела против NKG2A. В некоторых вариантах осуществления домен VH антитела против NKG2A связан с первым полипептидом, тогда как домен VL антитела против NKG2A связан со вторым полипептидом, который связывается с первым полипептидом таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом, образуя антиген-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления домен VH отделен от домена VL линкером, так что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например,

одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связывают с интересующим полипептидом. Кроме того, можно создать слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антитела связаны друг с другом. Это полезно, если кто-то хочет создать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи или если кто-то хочет создать биспецифическое антитело.

**[0085]** Для создания одноцепочечного антитела (scFv) VH и VL-кодирующие ДНК фрагменты оперативно связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 64), так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка, в котором домены VL и VH соединены гибким линкером. См., например, Bird et al., *Science* **242**:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5879-5883 (1988); и McCafferty et al., *Nature* **348**:552-554 (1990).

Одноцепочечное антитело может быть моновалентным, если используются только отдельные VH и VL; двухвалентным, если используются два VH и VL; или поливалентным, если используется более двух VH и VL. Могут быть получены биспецифические или поливалентные антитела, которые специфически связываются, например, с NKG2A человека и с другой молекулой.

**[0086]** В других вариантах осуществления другие модифицированные антитела можно получить с использованием молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело против NKG2A. Например, «каппа-тельца» (Ill et al., *Protein Eng.* **10**: 949-57 (1997)), «минитела» (Martin et al., *EMBO J.* **13**: 5303-9 (1994)), «диатела» (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6444-6448 (1993)), или «Janusins» (Traunecker et al., *EMBO J.* **10**:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Suppl.) **7**:51-52 (1992)) можно получить с использованием стандартных методов молекулярной биологии, следуя указаниям описания.

**[0087]** Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть настоящего изобретения могут быть дериватизированы или связаны с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). В общем, антитела или их части дериватизируются таким образом, что дериватизация или мечение не оказывают негативного влияния на связывание NKG2A. Соответственно, предполагается, что антитела и части антител по настоящему изобретению

включают как интактные, так и модифицированные формы антител против NKG2A человека, описанных в данном документе. Например, антитело или часть антитела по настоящему изобретению могут быть функционально связаны (посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или ди-антитело), детектирующий агент, фармацевтический агент и/или белок или пептид, который может опосредовать ассоциацию антитела или части антитела с другой молекулой (такой как область стрептавидинового ядра или полигистидиновая метка).

**[0088]** Один тип дериватизированного антитела получают путем перекрестного сшивания двух или более антител (одного и того же типа или разных типов, например, для создания биспецифических антител). Подходящие сшивающие агенты включают те, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две явно реакционноспособные группы, разделенные подходящим спейсером (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир), или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры доступны, например, в Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

**[0089]** Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть также могут быть дериватизированы химической группой, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильной или этильной группой или углеводной группой. Эти группы могут быть полезны для улучшения биологических характеристик антитела, например, для увеличения периода полувыведения из сыворотки.

**[0090]** Антитело или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению также могут быть помечены. Используемые в данном описании термины «метка» или «меченый» относятся к включению другой молекулы в антитело. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой поддающийся обнаружению маркер, например, включение радиоактивно меченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью маркированного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). В некоторых вариантах осуществления метка

или маркер может быть терапевтическим, например, конъюгатом лекарственного средства или токсином. В данной области известны и могут быть использованы различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов. Примеры меток для полипептидов включают, помимо прочего, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары лейциновых застёжек, сайты связывания для вторичных антител, металл связывающие домены, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидрокси антрацин-дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки прикрепляются с помощью спейсерных групп различной длины для уменьшения потенциальных стерических затруднений.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с цитотоксическим агентом с образованием иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с радиоизотопом.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттерийонные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления антитела могут образовывать комплекс с противоионом с образованием фармацевтически приемлемой соли.

#### *Композиции антител против NKG2A*

**[0093]** Настоящее изобретение также обеспечивает комбинированную терапию (например, композицию), которая содержит одно, два, три, четыре или более антител против NKG2A или их антигенсвязывающих частей, описанных в

настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия (например, композиция) содержит два антитела против NKG2A или антигенсвязывающие части. Комбинированная терапия может принимать форму, например, способа лечения с использованием указанных антител или

5 антигенсвязывающих частей или фармацевтической композиции, содержащей указанные антитела или антигенсвязывающие части.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первое антитело против NKG2A или его антигенсвязывающую часть и второе антитело против NKG2A или его

10 антигенсвязывающую часть, причем первое и второе антитела представляют собой:

- антитела 23765 и 23686, соответственно;
- антитела 23765 и 24208, соответственно;
- антитела 23765 и 23566, соответственно;

15

- антитела 23765 и 23925, соответственно;
- антитела 23765 и 24135, соответственно;
- антитела 23686 и 24208, соответственно;
- антитела 23686 и 23566, соответственно;
- антитела 23686 и 23925, соответственно;

20

- антитела 23686 и 24135, соответственно;
- антитела 24208 и 23566, соответственно;
- антитела 24208 и 23925, соответственно;
- антитела 24208 и 24135, соответственно;
- антитела 23566 и 23925, соответственно;

25

- антитела 23566 и 24135, соответственно; или
- антитела 23925 и 24135, соответственно.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с тем же эпитопом, что и указанные первое и второе антитела, или конкурируют за

30 связывание с ними.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит

аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 указанного второго антитела.

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которое содержит VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, указанного второго антитела.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности VH и VL указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности VH и VL указанного второго антитела.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности HC и LC указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности HC и LC указанного второго антитела.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления указанная композиция может содержать одно, два или более антител или их антигенсвязывающие части, выбранные из группы, состоящей из таких как:

- а) антитело, содержащее H-CDR1-3, которое содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, 15-17, 25-27, 35-37, 45-47 или 55-57, соответственно;
- б) антитело, последовательность VH которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53;
- в) антитело, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53;

г) антитело, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, 13 и 61, 23 и 61, 33 и 61, 43 и 61, или 53 и 61;

д) антитело, содержащее L-CDR1-3, которое содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, 18-20, 28-30, 38-40, 48-50 или 58-60, соответственно;

е) антитело, последовательность VL которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54;

ж) антитело, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54;

з) антитело, LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62, 14 и 62, 24 и 62, 34 и 62, 44 и 62, или 54 и 62;

и) антитело, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-10, 15-20, 25-30, 35-40, 45-50 или 55-60, соответственно;

й) антитело, содержащее VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере, на 90% идентичные аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44 или 53 и 54, соответственно;

к) антитело, содержащее VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44, или 53 и 54, соответственно; и

л) антитело, содержащее HC и LC, которые содержат аминокислотные последовательности 3 и 61, и 4 и 62; 13 и 61, и 14 и 62; 23 и 61, и 24 и 62; 33 и 61, и 34 и 62; 43 и 61, и 44 и 62; или 53 и 61, и 54 и 62; соответственно.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления композиция антитела против NKG2A, описанная в настоящем документе, может ингибировать рост опухоли и/или вызывать регрессию опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления композиция антитела против NKG2A, описанная в настоящем документе, может замедлять или обращать вспять метастазирование у онкологического пациента. В некоторых вариантах осуществления композиция антитела против NKG2A, описанная в настоящем документе, может продлевать выживаемость онкологического пациента.

**[0102]** Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения композиции антитела против NKG2A, описанной в настоящем документе, включающий предоставление первого антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части и второго антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части и смешивание двух антител или частей.

*Биспецифические связывающие молекулы*

**[0103]** Настоящее изобретение также относится к биспецифической связывающей молекуле, обладающей специфичностью связывания (например, содержащей антигенсвязывающие части, такие как шесть CDR или VH и VL) антитела против NKG2A, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая связывающая молекула дополнительно обладает специфичностью связывания другого, отличного антитела против NKG2A (например, другого антитела против NKG2A, описанного в настоящем документе) или антитела, которое нацелено на другой белок, такой как раковый антиген или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует такое болезненное состояние, как рак. Такие биспецифические связывающие молекулы известны в данной области техники, и примеры различных типов биспецифических связывающих молекул приведены в других местах настоящего документа.

*Векторы и молекулы нуклеиновой кислоты*

**[0104]** Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты и последовательностям, кодирующим антитела против NKG2A или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления разные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части.

**[0105]** Ссылка на нуклеотидную последовательность включает в себя ее комплементарную последовательность, если не указано иное. Таким образом, ссылку на нуклеиновую кислоту, имеющую конкретную последовательность, следует понимать как охватывающую ее комплементарную нить с ее комплементарной последовательностью. Термин «полинуклеотид», как он



упоминается в настоящем документе, означает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов, либо модифицированную форму нуклеотида любого типа. Этот термин включает одно- и двухцепочечные формы.

5           **[0106]** В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое, антитела против NKG2A или его антигенсвязывающей части, описанных в  
10           данном документе.

**[0107]** Настоящее изобретение также обеспечивает нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной или более нуклеотидным  
15           последовательностям, перечисленным в настоящем документе, например, нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51 и 52, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 13, 14, 23, 24, 33, 34, 43,  
20           44, 53 и 54. Термин «процент идентичности последовательностей» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относится к остаткам в двух последовательностях, которые одинаковы при выравнивании для максимального соответствия. При сравнении на идентичность длина последовательностей может составлять по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей  
25           мере около 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере около 24 нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 28 нуклеотидов, более типично по меньшей мере около 32 нуклеотидов и предпочтительно по меньшей мере примерно 36, 48 или более нуклеотидов.

          В данной области известен ряд различных алгоритмов, которые можно  
30           использовать для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием программ FASTA, Gap или Bestfit, которые входят в пакет Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, Висконсин. FASTA, которая включает в себя, например, программы FASTA2 и

FASTA3, обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (см., например, Pearson, *Methods Enzymol.* **183**:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* **132**:185-219 (2000); 5 Pearson, *Methods Enzymol.* **266**:227-258 (1996); и Pearson, *J. Mol. Biol.* **276**:71-84 (1998); включенные в данное описание с помощью ссылки). Если не указано иное, используются параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между 10 последовательностями нуклеиновых кислот можно определить с помощью FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова *b* и фактор *NOPAM* для оценочной матрицы) или с использованием *Gap* с параметрами по умолчанию, как представлено в GCG версии 6.1, включенном в настоящий документ с помощью ссылки.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение 15 относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51 и 52. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, 11 и 12, 21 и 22, 31 и 32, 41 и 42 или 51 и 52.

**[0109]** В любом из вышеуказанных вариантов осуществления молекулы 20 нуклеиновой кислоты могут быть выделены. Молекулы нуклеиновой кислоты, называемые в данном документе «выделенными» или «очищенными», представляют собой нуклеиновые кислоты, которые (1) были отделены от нуклеиновых кислот геномной ДНК или клеточной РНК источника их 25 происхождения; и/или (2) не встречаются в природе.

**[0110]** В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии одной или обеих цепей антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе. Термин «вектор», используемый в настоящем документе, означает молекулу 30 нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевой двухцепочечный фрагмент ДНК, в который могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они

оперативно связаны. Такие векторы называются здесь «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»).

**[0111]** Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют тяжелую цепь, легкую цепь или как тяжелую, так и легкую цепи антитела против NKG2A, как описано в настоящем документе, или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению содержит молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды. Вектор может дополнительно содержать последовательность контроля экспрессии.

**[0112]** Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в настоящем документе, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы обработки РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при желании, последовательности, усиливающие секрецию белка. Природа таких управляющих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие контрольные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосом и последовательность терминации транскрипции; у эукариот такие контрольные последовательности обычно включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Предполагается, что термин «контрольные последовательности» включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых существенно для экспрессии и процессинга, а также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию.

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH из антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Аналогично, молекула нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL из антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

**[0114]** В дополнительном аспекте настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VH и/или VL, могут быть «преобразованы» в гены полноразмерных антител. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH или VL, преобразуются в гены полноразмерных антител путем вставки в вектор экспрессии, уже кодирующий константную область тяжелой цепи (CH) или константную область легкой цепи (CL), соответственно, так что сегмент VH функционально связан с сегментом(ами) CH внутри вектора, и/или сегмент VL функционально связан с сегментом CL внутри вектора. В другом аспекте молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH и/или VL, преобразуются в гены полноразмерных антител путем связывания, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей область CH и/или CL, с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, затем могут быть экспрессированы из клетки, в которую они были введены, а антитело против NKG2A выделено.

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления каркасную область(и) мутируют таким образом, чтобы полученная каркасная область(и) имела аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутация может быть произведена в каркасной области или константной области, например, для увеличения периода полувыведения антитела против NKG2A. См., например, публикацию PCT WO 00/09560. Мутация в каркасной

области или константной области также может быть произведена для изменения иммуногенности антитела и/или для обеспечения сайта для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. Согласно настоящему изобретению, антитело может иметь мутации в любой одной или нескольких CDR или каркасных областях переменного домена или в константной области.

*Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител*

**[0116]** Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения композиций антител и антител и их антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, включающему предоставление клетки-хозяина (например, рекомбинантной клетки-хозяина), содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или её антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, описанных в настоящем документе; культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или антигенсвязывающей части; и выделение полученного антитела или антигенсвязывающей части. Антитела или антигенсвязывающие части, полученные посредством такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, называются в данном документе «рекомбинантными» антителами или антигенсвязывающими частями. Настоящее изобретение также относится к клеткам-потомкам таких клеток-хозяев и антителам или антигенсвязывающим частям, продуцируемым ими.

**[0117]** Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), используемый в настоящем документе, означает клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. По определению, рекомбинантная клетка-хозяин не встречается в природе. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут содержать, например, вектор, описанный в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые содержат, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то, и другое, антитела против NKG2A или его антигенсвязывающей

части, описанных в настоящем документе. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную клетку-объект, но также и потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут произойти в последующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», используемого в настоящем документе.

**[0118]** Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против NKG2A и их антигенсвязывающие части, а также векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, можно использовать для трансфекции подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей. Трансформация может осуществляться любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов.

**[0119]** Вполне вероятно, что антитела, экспрессируемые разными клеточными линиями или у трансгенных животных, будут иметь отличающиеся друг от друга паттерны гликозилирования. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, представленными в настоящем документе, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящем документе, являются частью настоящего описания, независимо от состояния гликозилирования антител и, в более общем смысле, независимо от присутствия или отсутствия пост-трансляционной(ых) модификации(й).

*30 Фармацевтические композиции*

**[0120]** Другим аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) антитело против NKG2A или его антигенсвязывающую часть, композицию антител или биспецифическую

связывающую молекулу по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предназначены для облегчения, профилактики и/или лечения рака, например, рака, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рак находится в таких тканях, как кожа, легкие, кишечник, толстая кишка, яичник, мозг, предстательная железа, почки, мягкие ткани, кровеносная система, голова и шея, печень, кости, мочевого пузыря, молочная железа, желудок, матка, шейка матки и поджелудочная железа.

10           **[0121]** Фармацевтические композиции по настоящему изобретению будут содержать одно или несколько антител против NKG2A, антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению, например, одно или два антитела против NKG2A, антигенсвязывающие части, или биспецифические связывающие молекулы. В  
15 некоторых вариантах осуществления композиция содержит одно антитело против NKG2A по настоящему изобретению или его антигенсвязывающую часть. В другом аспекте композиция содержит два различных антитела против NKG2A по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие части.

20           **[0122]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело против NKG2A или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению, например, одно антитело или часть против NKG2A, и одно или несколько дополнительных антител, которые нацелены на один или несколько соответствующих рецепторов клеточной поверхности, например, один или несколько рецепторов, связанных с  
25 раком.

30           **[0123]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело против NKG2A или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению, например, одно антитело против NKG2A или часть, и один или несколько дополнительных агентов, выбранных, например, из иммуностимулирующего агента, вакцины, химиотерапевтического агента, противоопухолевого агента, антиангиогенного агента и ингибитора тирозинкиназы.

**[0124]** Как правило, антитела, антигенсвязывающие части и биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению подходят

для введения в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, например, как описано ниже.

**[0125]** Термин «наполнитель» используется в данном документе для описания любого ингредиента, кроме соединения(й) настоящего изобретения.

5 Выбор наполнителя(ей) будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый наполнитель» включает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, 10 замедляющие абсорбцию, и т.п., которые физиологически совместимы. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых наполнителей являются вода, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих 15 случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие агенты или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, 20 которые увеличивают срок хранения или эффективность антигеля.

**[0126]** Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их получения будут очевидны специалистам в данной области. Такие композиции и способы их приготовления можно найти, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19-ое издание (Mack Publishing Company, 1995).

25 Фармацевтические композиции предпочтительно производятся в условиях GMP (надлежащей производственной практики).

**[0127]** Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана оптом, в виде разовой единичной дозы или в виде множества разовых доз. В настоящем документе «стандартная 30 доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.



**[0128]** Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический физиологический раствор. Такие составы могут быть  
5 приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме единичной дозы, например, в ампулах или контейнерах на несколько доз, содержащей консервант. Составы для парентерального введения включают, помимо прочего, суспензии, растворы,  
10 эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и т.п. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, помимо прочего, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В некоторых вариантах осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставляется в сухой (т.е.  
15 порошковой или гранулированной) форме для разведения подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Парентеральные составы также включают водные растворы, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно с рН от 3 до 9), но для  
20 некоторых применений они могут быть более подходящими в виде стерильного неводного раствора или в высушенной форме для использования в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода. Типичные формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. При желании такие лекарственные формы могут быть  
25 соответствующим образом забуферены. Другие полезные для парентерального введения составы включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в виде липосомального препарата.

*Терапевтическое применение антител и композиций настоящего изобретения*  
30

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления антитела против NKG2A и их антигенсвязывающие части, композиции антител против NKG2A и биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению используются для усиления или активации иммунной системы у пациента

(например, млекопитающего, такого как человек) при необходимости, например, путем усиления активности NKG2A<sup>+</sup> NK-клеток или Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления у пациента наблюдается подавление иммунитета. В некоторых вариантах осуществления врач может повысить противораковую активностью собственной иммунной системы пациента путем введения антитела против NKG2A или его антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы, как описано в настоящем документе. Например, врач может усилить противоопухолевую активность у пациента путем введения антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, композиции антител или биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами (последовательно или одновременно).

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, композиции или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению предназначены для применения при лечении рака. Рак может локализоваться в одной или нескольких тканях, таких как кожа, легкие, кишечник, толстая кишка, яичник, мозг, предстательная железа, почки, мягкие ткани, кровеносная система, голова и шея, печень, кости, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка матки и поджелудочная железа.

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, лечение которых осуществляют антителами против NKG2A, антигенсвязывающими частями, композициями и биспецифическими связывающими молекулами по настоящему изобретению, могут включать, например, меланому (например, распространенную или метастатическую меланому), базальноклеточный рак кожи, глиобластому, глиому, глиосаркому, астроцитому, менингиому, нейробластому, адренокортикальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак полости рта, рак слюнной железы, рак носоглотки, рак молочной железы, рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак пищевода, рак желудочно-пищеводного перехода, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, первичный рак брюшины, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желчевыводящих путей, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальную карциному, рак яичников, рак фаллопиевой

трубы, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевых путей, уротелиальный рак, почечно-клеточный рак, рак почки, рак мочеполовой системы, рак шейки матки, рак предстательной железы, фибросаркому, липосаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, гистиоцитому, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, рак  
5 аппендикита, распространенный рак клеток Меркеля, множественную миелому, саркомы, хориокарциному, эритролейкемию, острый лимфобластный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, тучноклеточный лейкоз, малую лимфоцитарную  
10 лимфому, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, моноцитарную лимфому, HTLV-ассоциированный Т-клеточный лейкоз/лимфому, мезотелиому и солидные опухоли. Рак может находиться, например, на ранней, промежуточной, поздней, местно-распространенной или  
15 метастатической стадии, а также может рецидивировать или быть рефрактерным к другим методам лечения (например, к другим терапевтическим средствам против NKG2A или ингибиторам контрольных точек) или может отсутствовать стандартная доступная терапия.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления состояния, которые лечатся  
20 антителами против NKG2A, антигенсвязывающими частями, композициями и биспецифическими связывающими молекулами по настоящему изобретению, могут включать, например, рак головы и шеи, рак молочной железы (например, HER2-положительный рак молочной железы), колоректальный рак, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак пищевода, острый миелолейкоз,  
25 острый лимфобластный лейкоз, миелодиспластические синдромы, множественную миелому, хронический лимфоидный лейкоз, хронический миелолейкоз, миелопролиферативное новообразование, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления антитела или их  
30 антигенсвязывающие части, композиции или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению предназначены для применения при лечении иммунного расстройства.

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая

молекула могут быть использованы для лечения пациента, у которого имеется ослабленный иммунитет или есть риск его ослабления (например, вследствие химиотерапевтической или лучевой терапии). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула могут быть использованы для 5 размножения стволовых клеток у пациента после трансплантации стволовых клеток.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула предназначены для применения при лечении вирусных и/или паразитарных инфекций, например, когда патогены ингибируют иммунный ответ хозяина. Патогеном может быть, например, ВИЧ, гепатит (А, В или С), вирус папилломы человека (ВПЧ), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), аденовирус, флавивирус, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, 15 респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, Т-клеточный лимфотрофный вирус человека (HTLV), цитомегаловирус человека (HCMV), вирус денге, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус Джона Каннингема (JC), вирус арбовирусного энцефалита, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), грипп, герпес, 20 лямблии, малярия, лейшмания, золотистый стафилококк или синегнойная палочка.

**[0136]** «Лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к способу облегчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. В настоящем документе «облегчение» 25 заболевания, расстройства или состояния означает снижение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, ссылки в данном документе на «лечение» включают ссылки на лечебное, паллиативное и профилактическое лечение.

**[0137]** «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству вводимого терапевтического агента, которое в некоторой степени облегчит один или несколько симптомов заболевания, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество противоракового лекарственного средства может, например, привести к задержке роста опухоли, уменьшению опухоли, увеличению выживаемости, уничтожению раковых клеток, замедлению 30

или уменьшению прогрессирования заболевания, обращению вспять метастазов или другим клиническим конечным результатам, желаемым медицинскими работниками.

**[0138]** Антитела против NKG2A или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в виде любой их комбинации). Таким образом, фармацевтические композиции, способы и применения, описанные в настоящем документе, также охватывают варианты осуществления комбинаций (совместное введение) с другими активными агентами, как подробно описано ниже.

**[0139]** В настоящем документе термины «совместное введение», «совместно вводимый» и «в комбинации с», относящиеся к антителам против NKG2A и их антигенсвязывающим частям, композициям антител и биспецифическим связывающим молекулам по настоящему изобретению с одним или несколькими другими терапевтическими агентами означают, относятся и включают в себя следующее:

а) одновременное введение такой комбинации антитела/ антигенсвязывающей части/ композиции антитела/ биспецифической связывающей молекулы настоящего изобретения и терапевтического агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены вместе в единую лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты по существу одновременно в организме указанного пациента,

б) по существу одновременное введение такой комбинации антитела/ антигенсвязывающей части/ композиции антитела/ биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению и терапевтического агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые принимаются указанным пациентом по существу в одно и то же время, после чего указанные компоненты высвобождаются в организме указанного пациента по существу в одно и то же время,

в) последовательное введение такой комбинации антитела/ антигенсвязывающей части/ композиции антител/ биспецифической связывающей молекулы настоящего изобретения и терапевтического агента(ов)

пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые принимаются указанным пациентом последовательно, со значительным интервалом времени между каждым введением, при этом указанные компоненты высвобождаются в организме указанного пациента в существенно разное время;

г) последовательное введение такой комбинации антитела/ антигенсвязывающей части/ композиции антител/ биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению и терапевтического агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены вместе в единую лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, после чего они высвобождаются одновременно, последовательно и/или перекрывающимся образом в одно и то же и/или разное время в организме указанного пациента, причем каждая часть может быть введена либо одним и тем же, либо различным путем.

**[0140]** Антитела против NKG2A или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению можно вводить без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии (монотерапии).

Альтернативно, лечение антителами против NKG2A или их антигенсвязывающими частями, композициями антител или биспецифическими связывающими молекулами по настоящему изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированную терапию), например, другой иммуностимулирующий агент, противораковый агент (например, химиотерапевтический агент, противоопухолевый агент, антиангиогенный агент или ингибитор тирозинкиназы) или вакцину (например, противоопухолевую вакцину).

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антитела или биспецифическая связывающая молекула могут вводиться совместно или составляться с другим лекарственным средством/лекарственным препаратом для лечения рака. Дополнительное терапевтическое лечение может включать, например, иммуностимулирующий агент, вакцину, химиотерапевтический агент,

противоопухолевый агент, антиангиогенный агент, ингибитор тирозинкиназы и/или лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое лечение может включать другое противораковое антитело.

**[0142]** Фармацевтические изделия, содержащие антитело против NKG2A или его антигенсвязывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, описанную в настоящем документе, и по меньшей мере один другой агент (например, химиотерапевтический, противоопухолевый или антиангиогенный агент) могут быть использованы в качестве комбинированного лечения для одновременного, раздельного или последовательного введения при терапии рака. Другим агентом может быть любой агент, подходящий для лечения конкретного рассматриваемого рака, например, агент, выбранный из группы, состоящей из алкилирующих агентов, например, производных платины, таких как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительные алкоиды, например, паклитаксел, доцетаксел и/или иринотекан; противоопухолевые антибиотики, например, доксорубин (адриамицин), даунорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон, дактиномицин, блеомицин, актиномицин, лютеомицин и/или митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан; антиметаболиты, например, фторурацил и/или другие фторпиримидины; ФОЛФОКС (FOLFOX); осимертиниб; циклофосфамид; антрациклин; дакарбазин; гемцитабин; или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, композиция антитела или биспецифическая связывающая молекула, описанные в настоящем документе, восстанавливают чувствительность к другому агенту

**[0143]** Антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению также могут быть использованы в комбинации с другими противораковыми методами лечения, такими как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов, иммуностимулирующие соединения и Т-клеточная терапия. В случае вакцины это может быть, например, белковая, пептидная или ДНК-вакцина, содержащая один или несколько антигенов, которые подходят для лечения рака, или вакцина, содержащая дендритные клетки вместе с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN-гамма и GM-CSF. Примером типа ингибитора фермента, обладающего противораковой

активностью, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Также рассматривается адоптивная Т-клеточная терапия, которая относится к различным методам иммунотерапии, которые включают расширение или создание собственных Т-клеток пациентов для распознавания опухолей и атаки на них.

5 [0144] Также предполагается, что антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению могут быть использованы в дополнительной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Это 10 синтетические, в основном производные хиназолина, низкомолекулярные молекулы, которые взаимодействуют с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецепторов и ингибируют лиганд-индуцированное фосфорилирование рецептора, например, конкурируя за внутриклеточный сайт связывания Mg-АТФ.

15 [0145] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула могут использоваться в комбинации с лекарственным средством/лекарственным препаратом, которое(ый) опосредует активацию иммунной системы, включая, помимо прочего, агент, который модулирует 20 экспрессию или активность A2AR, A1AR, A2BR, A3AR, ADA, ALP, AXL, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD116, CD123, CD27, CD28, CD39, CD40, CD47, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), EGFR, FLT3, NKG2AL, GAL9, GITR, HVEM, LAG-3, LILRB1, LY108, LAIR1, MET, ICOS, IDO, IL2R, IL4R, KIR, 25 LAIR1, PAP, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, STING, TIGIT, TIM-3, TGFR-бета, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR10, TNFR2, VEGFR, VEGF, VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой низкомолекулярный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело или его 30 антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с одной из вышеуказанных молекул. Также предполагается, что антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению могут быть использованы в



комбинации с цитокином (например, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 или IL-21), ингибитором EGFR, ингибитором VEGF и т.д.

**[0146]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антитела или биспецифическая связывающая молекула могут быть использованы в комбинации с трастузумабом, пембролизумабом, ниволумабом, дурвалумабом, ибрутинибом, цетуксимабом, авелумабом, ритуксимабом, маргетуксимабом, тафаситамабом, бевацизумабом, трастузумабом, дерукстеканом, трифлуридином, типирацилом, трифлуридином/типипирацилом, иринотеканом, гемцитабином, оксалиплатином, бендамустином, FOLFOX (например, mFOLFOX6) или любой их комбинацией.

**[0147]** В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула могут использоваться в комбинации с агентом, который модулирует экспрессию или активность CD94, с агентом, который модулирует экспрессию или активность HLA-E, или с обоими.

**[0148]** Настоящее изобретение также предполагает использование последовательностей (например, шести последовательностей CDR или VH и VL) антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части, описанных в настоящем документе, при получении химерного антигенного рецептора, который может быть использован в CAR-T технологии.

**[0149]** Понятно, что антитела и их антигенсвязывающие части, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению могут использоваться в способе лечения, как описано в настоящем документе, могут использоваться в лечении, как описано в настоящем документе, и /или могут использоваться при производстве лекарственного средства для лечения, как описано в настоящем документе.

#### *Доза и способ применения*

**[0150]** Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению можно вводить в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подлежащее лечению, возраст, пол и вес пациента, а также от того,

вводятся ли антитела в качестве самостоятельного лечения или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами лечения рака.

**[0151]** Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от требований терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и единообразия дозировки. Форма единичной дозировки, используемая в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация единичных дозированных форм настоящего изобретения обычно продиктована и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик терапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который должен быть достигнут, и (б) ограничений, присутствующих в области создания такого активного соединения для лечения чувствительности у людей.

**[0152]** Таким образом, на основании раскрытия, представленного в настоящем документе, специалисту в данной области техники будет понятно, что доза и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в области терапии. То есть можно легко установить максимально переносимую дозу, а также можно определить эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемую терапевтическую пользу пациенту, а также временные требования для введения каждого агента для обеспечения обнаруживаемой терапевтической пользы пациенту. Соответственно, хотя здесь проиллюстрированы определенные дозы и схемы введения, эти примеры никоим образом не ограничивают дозу и схему введения, которые могут быть предоставлены пациенту при применении по настоящему изобретению.

**[0153]** Следует отметить, что значения доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, которое необходимо облегчить, и могут включать однократные или множественные дозы. Следует также

понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением человека, вводящего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны доз, изложенные в настоящем документе, являются только примерными и не предназначены для ограничения объема или применения воплощенной композиции. Кроме того, режим дозирования композиций по настоящему изобретению может основываться на множестве факторов, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояние здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретное используемое антитело. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но его можно определять рутинно с использованием стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты, и/или лабораторные показатели. Таким образом, настоящее изобретение охватывает повышение дозы внутри организма пациента, как это определено специалистом в данной области техники. Определение подходящих дозировок и схем лечения хорошо известно в соответствующей области техники, и будет понятно, что это будет доступно специалисту в данной области, как только ему предоставят идеи, раскрытые в данном документе.

**[0154]** Эффективное количество для терапии опухолей можно измерить по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания и/или облегчить симптомы у пациента и предпочтительно обратить вспять прогрессирование заболевания, например, за счет уменьшения размера опухоли. Способность антитела, антигенсвязывающей части, композиции антител или биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению ингибировать рак можно оценить с помощью анализов *in vitro*, например, как описано в примерах, а также на подходящих животных моделях, которые предсказывают эффективность при опухолях человека. Подходящие схемы дозирования будут выбраны для обеспечения оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, например, в виде однократного болюса или в виде непрерывной инфузии, и с возможной регулировкой дозировки, как указано в каждом конкретном случае.

**[0155]** Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению можно вводить любым способом для введения пептидов, белков или антител, принятых в данной области техники, и они обычно подходят для парентерального введения. В настоящем документе «парентеральное введение» включает любой путь введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением через повреждение в ткани, что обычно приводит к прямому введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничивается этим, введение посредством инъекции, введение через хирургический разрез, введение через проникающую в ткань нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную, интрацистернальную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутриуретральную, внутричерепную, внутриопухолевую и внутрисиновиальную инъекцию или инфузию. Конкретные варианты осуществления включают внутривенный и подкожный пути введения.

*Диагностическое применение и композиции*

**[0156]** Антитела и антигенсвязывающие части настоящего изобретения также применимы в диагностических процессах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела и антигенсвязывающие части можно использовать для обнаружения и/или измерения уровня NKG2A в образце от пациента (например, образце ткани или образце жидкости организма, такой как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, кишечная жидкость, слюна или моча). Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология. Настоящее изобретение дополнительно охватывает наборы (например, диагностические наборы), содержащие антитела и антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе.

*Изделия и наборы*

**[0157]** Настоящее изобретение также относится к изделиям производства, например, наборам, содержащим один или несколько контейнеров (например, одноразовых или многоразовых контейнеров), содержащих фармацевтическую

композицию антитела против NKG2A или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу, описанные в настоящем документе, необязательно дополнительную биологически активную молекулу (например, другой терапевтический агент) и инструкции по применению. Антитело или антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула и необязательно дополнительная биологически активная молекула могут быть упакованы отдельно в подходящую упаковку, такую как флакон или ампула, изготовленная из инертного стекла или пластика. В некоторых вариантах осуществления флакон или ампула содержит концентрированный исходный раствор (например, 2х, 5х, 10х или более) антитела или антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы и, необязательно, биологически активной молекулы. В некоторых вариантах осуществления изделия производства, такие как наборы, включают медицинское устройство для введения антитела или антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы и/или биологически активной молекулы (например, шприц и игла); и/или соответствующий разбавитель (например, стерильная вода и физиологический раствор). Настоящее изобретение также включает способы изготовления указанных изделий.

**[0158]** Если здесь не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны принимать значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Типичные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, также могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения. В случае противоречий преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения.

**[0159]** Как правило, номенклатура, используемая в связи с методами культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, а также химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанных в настоящем документе, которые описаны в настоящем документе, представляет собой номенклатуру, которая хорошо известна и широко используются в данной области техники.

Ферментативные реакции и методы очистки проводят в соответствии со спецификациями производителя, как это обычно делается в данной области техники или как описано в данном документе.

5 [0160] Кроме того, если иное не требуется из контекста, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. В этом описании и вариантах осуществления слова «иметь» и «содержать» или их варианты, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

10 [0161] Все публикации и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей своей полноте. Хотя в данном описании цитируется ряд документов, это цитирование не означает признания того, что любой из этих документов составляет часть общеизвестных знаний в данной области техники.

15 [0162] Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры предназначены только для целей иллюстрации и не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения каким-либо образом.

20

## ПРИМЕРЫ

### **Пример 1. Клонирование антител против NKG2A из В-клеток крысы**

#### Материалы и способы

25 [0163] Антитела против NKG2A человека были выделены из набора антител, полученного от крыс OmniRat<sup>®</sup> (Osborn et al., *J Immunol.* 190(4): 1481-90 (2013)), трансгенной линии крыс от Ligand Pharmaceuticals Inc., которая продуцирует антитела с полностью человеческими идиотипами. Клонирование генов антител, полученных от крыс, из одноклеточных В-клеток, секретирующих антитела (ASC), было выполнено с помощью технологии обнаружения антител Symplex<sup>™</sup> (Meijer et al., *J Mol Biol* **358(3)**: 764-72 (2006)).

30

[0164] Конструкции репертуара антител, кодирующие полностью человеческие иммуноглобулины в формате IgG<sub>1</sub>-LALA (см. ниже), трансфицировали в клетки НЕК293. Супернатанты клеток проверяли на связывание с NKG2A, экспрессируемым на поверхности клеток CHO, с

использованием проточной цитометрии в формате с высокой пропускной способностью. Реактивные NKG2A клоны анализировали путем секвенирования ДНК и экстрагировали последовательности ДНК, кодирующие антитела.

5 Выбранные клоны антител экспрессировали и функционально тестировали, как описано ниже.

**[0165]** Миссенс-мутации в аминоконцах тяжелых и легких цепей, которые были введены с использованием вырожденных праймеров при клонировании Symplex™ фрагментов кДНК, кодирующих антитела, были исправлены обратно к последовательности зародышевой линии. В Таблице 1 показаны нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи антител зародышевой линии, обозначенные 23765, 23686, 24208, 23566, 23925 и 24135. Процесс коррекции включает коррекцию аминоконцевой последовательности до зародышевой линии, а также оптимизацию использования кодонов. Мишени для сопоставления с последовательностями зародышевой линии человека идентифицировали путем поиска бластной гомологии переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи.

**[0166]** Белковые последовательности переменных доменов, константных областей и определяющих комплементарность областей (CDR) антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135 показаны в Таблице 2, Таблице 3 и Таблице 4 соответственно.

### Результаты

**[0167]** В Таблице 1 показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135.

25

**Таблица 1: Нуклеотидные последовательности переменных доменов антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135**

Ab	Последовательность (от 5' к 3')	SEQ
24208 VH	CAGGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGTGGAAGTCTGCGCACTGTCATGCGCCGCTTCCGGATTACCTTTTCTGACTACTATATGAGGTGGATCCGGCAGGCCCTGGAAAAGGGCTGGAATGGGTGTCACACATCTCCACTAGCGGCTCTACCATCTACTATGCTGACTCCGTCAAGGGCAGATTACAATTAGCCGCGATAACGCAAAAAATTCTCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTAATTTGCGCCAGGGACCATTACTATAGTCGTGGAGTGATCGGGTATTGGGGTTCAGGGCACCTGGTTCACAGTCTCG	1
23765 VH	GAGGTGCAGCTGGTTCGAAAGTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGTGGATCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCCAGGGTTACATTTTCTTGCTGTTCGCATGAACCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGAAAAGGACTGGAGTGGGTCTCCAGCATC	11

	TCTTCTTCATCCTCTTACATCTACTATGCTGACTCCGTGAAGGGAAGATTC ACTATCTCCCGCGATAACGCAAAAAATAGCCTGTATCTGCAGATGAACTCT CTGCGAGCAGAAGACACCGCCGTCTACTATTGTGCTAGGGATGGCTGGAAT GACGTGTTTGATTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCG	
23686 VH	GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGTGGATCA CTGCGACTGTCCTGCGCCGCTCCGGCTTACATTTTCTCTTACTCTATG AACTGGGTAGGCAGGCCCTGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTCTCTAGTATC TCATCCAGCTCTAGTTACATCTACTATGCTGACTCTGTGAAGGGCAGGTTTC ACTATCTCTCGGGATAACGCAAAAAATAGTCTGTATCTGCAGATGAATTCA CTGAGAGCAGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCTCGCGACGAATGGGGA CTGCTGGGGTTTGATTCTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCG	21
23566 VH	GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGAGGAGACCTGGTCCAGCCAGGAGTTCC CTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGCTTCACTTTTGATAACTACGCCATG CACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCCACTATC ACCAATAGCGGCGGAACACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGGAGGTTTC ACCCTGAGTCGGGATAACTCAAAAAATACACTGTACCTGCAGATGAACAGT CTGAGAGCTGAAGACACAGCAGTGTACTATTGTGCAAAGCCCACTACTAT GCTCGCGGCTATTTTCGATTTTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACTGTCTCG	31
23925 VH	GAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGTGGATCA CTGCGACTGTCCTGCGCCGCTCCGGATTACCTTTTCCAGTTACGCCATG AACTGGGTAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAACAATC TCTAATAGTGGAGGGACCACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGGTTTC ACAATTTCTCGGGACAACAGTAAAGATACTCTGTATCTGCAAATGAATTC CTGAGAGCTGAAGACACCGCAGTGTACTATTGTGCAAAGCCCACTACTAT GCTCGCGGCTACTTTGATTATTGGGGACAGGGGACTCTGGTCAACCGTCTCG	41
24135 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGGCCAGGTCTGGTGAAGCCCTCTGAAACA CTGAGTCTGACATGCACTGTTAGTGGCGGATCAGTCTCCAGCGGCCACTAC TATTGGTCTTGATTAGACAACCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGC TATATCTACTATTAGGATCCACCACATAACAACCTTCCCTGAAAAGCCGG GTGAGCATTTCTGTCGACACTTCAAAGCATCAGTTCAGTCTGAAACTGTCT AGTGTGACCGCCGCTGATACAGCTGTCTACTATTGTGCAAGATGGGCCGGG TCCTATCAGCCATACTATTACTATTACGGCATGGACGTGTGGGGGCAGGGT ACTACCGTCACCGTCTCG	51
24208 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCAGCGTTAGTGCTTCAGTCGGAGAT AGGGTGACCATCACATGCCGGGCTTCCCAGGGGATTTCTAGTTGGCTGGCA TGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCT TCATCCCTGCAAAGTGGCGTCCCATCTAGATTCTCCGGCAGCGGATCTGGG ACCGACTTTACTCTGACCATTAGTTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCAACA TACTATTGTCAGCAGGCCAACAGCTTCCCCTACACATTTGGTCAGGGCACT AACTGGAAATTAAG	2
23765 VL	GAGATCGTGCTGACTCAGAGCCCAGCAACCCTGTCACTGTCCCCGGAGAA AGGGCAACCCTGTCTTGCCGGGCCAGCCAGTCTGTCTCCTCTTACCTGGCT TGGTATCAGCAAAGCCCGGGCAGGCACCTCGACTGCTGATCTACGACGCC AGTAACAGAGCTACCGGAATTCCTCGCCCGCTTCCAGTGGTTCAGGCTCCGGA ACAGACTTTACCTGACAATCTCTAGTCTGGAGCCTGAAGATTTCCCGCTG TACTATTGTCAGCAGAGGTCTAATTGGCCACTGACATTTGGCGGAGGGACT AAGGTCGAGATCAAG	12
23686 VL	GAGATCGTGCTGACTCAGTCTCCTGCAACCCTGTCTCTGAGTCCCAGGCGAA AGGGCAACTCTGTCTGCGGGGCTCACAGTCCATTTCTAACTACCTGGCT TGGTATCAGCAAAGCCAGGACAGGCACCCCGACTGCTGATCTACGACGCC TCCAATAGAGCTACCGCATTCCTCGCCCGCTTCTCTGGCTCTGGATCAGGG ACAGACTTACCCCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCTGAAGACTTCGCCGTG TACTATTGTCAGCAGAGGACAGATTGGCCCCCTTGGACATTTGGTCAAGGC ACTAAGGTCGAGATCAAG	22
23566 VL	GACATCCAGATGACCCAGACACCTTCCAGCGTTAGTGCTTCAGTCGGAGAT	32



	AGGGTGACTATCACCTGCCGGGCTTCCCAGGGGATTTCTAGTTGGCTGGCA TGGTACCAGCAGAAGCCCCGAAAAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCT TCATCCCTGCAAAGTGGCGTCCCATCTAGATTCTCCGGCAGCGGATCTGGG ACTGACTTTACACTGACTATTAGCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTTCGCAACA TACTATTGTCAGCAGGCCAACTCCTTCCCCTACACCTTTGGTCAGGGCACA AAACTGGAAATTAAG	
23925 VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCGTTAGTGCTTCAGTCGGAGAT AGGGTGACCATCACATGCCGGGCTAGTCAGGGGATTTCTAGTTGGCTGGCA TGGTACCAGCAGAAGTCTGGAAAAGCCCCCAAGCTGCTGATCTATGCCGCT TCATCCCTGCAAATGGCGTCCCTTCCCATTCTCCGGCAGCGGATCTGGG ACCGACTTTACTCTGACCATCAGCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTTCGCAACA TACTATTGTCAGCAGGCCAACTCCTTCCCCTACACATTTGGTCAGGGCACT AAACTGGAAATTAAG	42
24135 VL	GACATCCAGATGACCCAGAGTCCTTCCAGCCTGTCAGCATCCGTGGGCGAC AGAGTACCATCACATGCCAGGCCTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAAT TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGGAAAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCC TCCAACCTGGAGAGGGGAGTGCCATCTCGGTTCCAGCGGTTCTGGCAGTGA ACCGATTTCACTTTTACCATCTCTTCTCTGCAACCAGAGGACATTTGCTACA TACTACTGTCAGCAGTACGATAACTTCCCCTGACATTTGGCGGAGGGACT AAAGTCGAAATCAAG	52

SEQ: SEQ ID NO.

5 [0168] В Таблице 2 показаны расшифрованные аминокислотные последовательности антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135. CDR выделены жирным шрифтом/подчеркнуты.

**Таблица 2: Аминокислотные последовательности переменных доменов антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135**

Ab	Последовательность (от N-конца к C-концу)	SEQ
24208 VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <b><u>GFTFSDYY</u></b> MRWIRQAPGKGLEWVSH <b><u>I</u></b> <b><u>STSGSTI</u></b> YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY <b><u>CARDHYY</u></b> <b><u>SRGVIGYW</u></b> QQTTLVTVSS	3
23765 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <b><u>GFTFSCCR</u></b> MNWVRQAPGKGLEWVSS <b><u>I</u></b> <b><u>SSSSSYI</u></b> YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY <b><u>CARDGWN</u></b> <b><u>DVFDYW</u></b> QQTTLVTVSS	13
23686 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <b><u>GFTFSSYS</u></b> MNWVRQAPGKGLEWVSS <b><u>I</u></b> <b><u>SSSSSYI</u></b> YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY <b><u>CARDEWG</u></b> <b><u>LLGFDSW</u></b> QQTTLVTVSS	23
23566 VH	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAAS <b><u>GFTFDNY</u></b> AMHWVRQAPGKGLEWVST <b><u>I</u></b> TNSGGTTYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <b><u>CAKAHYY</u></b> ARGYFDYFWGQQTTLVTVSS	33
23925 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <b><u>GFTFSSY</u></b> AMNWVRQAPGKGLEWVST <b><u>I</u></b> <b><u>SNSGGTTY</u></b> YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <b><u>CAKAHYY</u></b> <b><u>ARGYFDYW</u></b> QQTTLVTVSS	43
24135 VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <b><u>SGSVSGHY</u></b> WSWIRQPPGKGLEWIG Y <b><u>IYYSGST</u></b> TYNPSLKSRSISVDTSKHQFSLKLSVTAADTAVYY <b><u>CARWAG</u></b> <b><u>SYQPYYYYY</u></b> GMDVWGQGTTLVTVSS	53
24208 VL	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRAS <b><u>QGISSW</u></b> LAWYQQKPGKAPKLLIY <b><u>AA</u></b> <b><u>SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLT</u></b> ISSLQPEDFATYY <b><u>CQQANSFPYTF</u></b> GQGT KLEIK	4

23765 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>S</u> NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY <u>CQQRSNWPLTF</u> GGGT KVEIK	14
23686 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QISISNY</u> LAWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>S</u> NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY <u>CQQR</u> TDWPPWTFGGG TKVEIK	24
23566 VL	DIQMTQTPSSVSASVGDRTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>AA</u> <u>S</u> SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQANSFPYTF</u> GQGT KLEIK	34
23925 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKSGKAPKLLIY <u>AA</u> <u>S</u> SLQIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQANSFPYTF</u> GQGT KLEIK	44
24135 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQAS <u>QDISNY</u> LNWYQQKPGKAPKLLIY <u>DA</u> <u>S</u> NLQIGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYY <u>CQQYDNFPLTF</u> GGGT KVEIK	54

SEQ: SEQ ID NO.

**[0169]** В Таблице 3 показаны аминокислотные последовательности константных областей тяжелой и легкой цепи (CH и CL, соответственно). «IgG1 LALA» относится к наличию мутаций «LALA» в тяжелой цепи (L234A/L235A, пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT<sup>®</sup>), которые, как известно, снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG<sub>1</sub> (Hezareh et al., *J Virol.* **75**(24): 12161-68 (2001); Hessel et al., *Nature* **449**(7158): 101-04 (2007)).

10

**Таблица 3: Аминокислотные последовательности константной области антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135**

Фрагмент	Последовательность (от N-конца к C-концу)	SEQ
IgG <sub>1</sub> -LALA CH добавлена к VH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHFTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	61
Каппа CL добавлена к VL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	62

SEQ: SEQ ID NO.

**[0170]** В Таблице 4 показаны аминокислотные последовательности CDR тяжелой и легкой цепи антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135, где CDR определены в соответствии с системой IMGT<sup>®</sup>.

15

**Таблица 4: Аминокислотные последовательности CDR антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135**

Ab	Последовательность (от N-конца к C-концу)					
	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
24208	GFTFSDYY SEQ: 5	ISTSGSTI SEQ: 6	CARDHYYSRQVIGYW SEQ: 7	QGISSW SEQ: 8	AAS SEQ: 9	CQQANSFPYTF SEQ: 10
23765	GFTFSCCR SEQ: 15	ISSSSSYI SEQ: 16	CARDGWNDVFDYW SEQ: 17	QSVSSY SEQ: 18	DAS SEQ: 19	CQQRSNWPLTF SEQ: 20
23686	GFTFSSYS SEQ: 25	ISSSSSYI SEQ: 26	CARDEWGLLGFDSW SEQ: 27	QSIISNY SEQ: 28	DAS SEQ: 29	CQQRTDWPPTTF SEQ: 30
23566	GFTFDNYA SEQ: 35	ITNSGGTT SEQ: 36	CAKAHYIARGYFDWF SEQ: 37	QGISSW SEQ: 38	AAS SEQ: 39	CQQANSFPYTF SEQ: 40
23925	GFTFSSYA SEQ: 45	ISNSGGTT SEQ: 46	CAKAHYIARGYFDYW SEQ: 47	QGISSW SEQ: 48	AAS SEQ: 49	CQQANSFPYTF SEQ: 50
24135	GGSVSSGHYY SEQ: 55	IYYSGST SEQ: 56	CARWAGSYQPYIIII GMDVW SEQ: 57	QDISNY SEQ: 58	DAS SEQ: 59	CQQYDNFPLTF SEQ: 60

SEQ: SEQ ID NO:

- 5 **[0171]** В Таблице 5 представлена информация SEQ ID NO для антител 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135. Если не указано иное, последовательности представляют собой аминокислотные последовательности.

**Таблица 5: SEQ ID NO для антитела 24208, 23765, 23686, 23566, 23925 и 24135**

Название	VH nt	VL nt	VH aa	VL aa	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
24208	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
23765	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
23686	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
23566	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
23925	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
24135	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

10 nt: нуклеотид

aa: аминокислота

**Пример 2. Клонирование аналогов эталонного антитела против NKG2A**

- 15 **[0172]** В этом примере перечислены источники аминокислотных последовательностей и окончательный формат антител, используемых для создания аналогов эталонного антитела против NKG2A.

### Материалы и способы

[0173] Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи аналогов антитела в Таблице 6 были получены из указанной патентной публикации. Белковые последовательности были обратно транслированы в последовательности ДНК с использованием кодонов человека. Соответствующие последовательности ДНК были генно-синтезированы и клонированы в векторы экспрессии, содержащие константные домены тяжелой или легкой цепи человека, что привело к экспрессии полноразмерных антител. Изотип человеческого антитела, выбранный для экспрессии, указан в столбце формата антитела вместе с дополнительными мутациями, введенными в область Fc. Клетки CHO трансфицировали полученными экспрессирующими плазмидами с использованием стандартной системы экспрессии белка. Супернатанты антител очищали с использованием стандартной колоночной хроматографии для очистки белка А.

15 **Таблица 6. Перечень аналогов генно-синтезированных антител и соответствующий формат антитела**

Антитело	Формат антитела	Источник
Аналог монализумаба	IgG <sub>4</sub> -S228P	WO 2016/062851_A1 (SEQ ID NO: 2 и 7)
Монализумаб-IgG <sub>1</sub> -LALA	IgG <sub>1</sub> -LALA	WO 2016/062851_A1 (SEQ ID NO: 2 и 7)

### **Пример 3. Измерение кинетики связывания антител с гетеродимерами NKG2A/CD94 и NKG2C/CD94 человека**

20 [0174] В этом примере измеряется связывание антител против NKG2A с рекомбинантными гетеродимерами NKG2A/CD94 и NKG2C/CD94 человека (внеклеточные домены), измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

### Материалы и способы

25 [0175] Анализ кинетического связывания моноклональных антител против NKG2A (mAb) проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием микроспоттера непрерывного потока (CFM, Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США) в сочетании с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, Нидерланды). Внеклеточные домены (ECD) человека his-меченные NKG2A, NKG2C и FLAG-меченный CD94 совместно

30

экспрессировали с использованием системы экспрессии Expi293™ и очищали стандартной хроматографией Ni-NTA с последующей обработкой аффинным гелем anti-Flag M2 (A2220, Sigma). Кинетику связывания измеряли путем захвата mAb на G-a-hu-IgG Fc SensEye® в течение 15 минут с использованием CFM.

- 5 После обнаружения SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96, а иммобилизованные моноклональные антитела mAb фиксировали с помощью набора SensEye FixIt. Кинетический анализ проводили, применяя серию кинетического титрования, вводя возрастающие концентрации антигенов от 1,6 нМ до 400 нМ в виде 2-кратных разведений. После каждого цикла инъекции  
10 антигена поверхность регенерировали с помощью 100 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3. Ассоциацию и диссоциацию антигена измеряли в течение 15 минут. Записанные ответы связывания вносили в простую модель связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Scrubber 2.0 для расчета констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $k_d$ ) и аффинности ( $K_D$ ).  
15 Кинетические параметры связывания измеряли как среднее значение трех независимых точек измерения.

### Результаты

- [0176] Аффинность связывания и кинетические параметры моноклональных антител mAb против NKG2A, связывающихся с  
20 гетеродимерами NKG2A/CD94 и NKG2C/CD94, показаны в Таблице 7. Аффинность связывания ( $K_D$ ) mAb 24208, 23925, 23566 и 24135 для NKG2A/CD94 была в 30 - 50 раз сильнее, чем их аффинность связывания с NKG2C/CD94. MAb 23686 имело аналогичную аффинность связывания с NKG2A/CD94 и NKG2C/CD94. Ни одно из моноклональных антител не связалось  
25 с гомодимером CD94 (данные не показаны).

[0177] Таким образом, моноклональные антитела против NKG2A, 24208, 23925, 23566 и 24135, обладают высокой специфичностью связывания в отношении NKG2A по сравнению с NKG2C. MAb 23686 связывает NKG2A и NKG2C с одинаковой аффинностью.

- 30 **Таблица 7. Кинетика связывания моноклональных антител против NKG2A с ECD NKG2A/CD94 или NKG2C/CD94 человека, измеренная с помощью SPR**

MAb	ECD	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (нМ)	SD, n=3, $K_D$ (нМ)
-----	-----	--	--------------------------	------------	---------------------

24208	HuNKG2A/huCD94	5,9E+05	1,5E-03	2,6	0,3
	HuNKG2C/huCD94	1,0E+04	1,2E-03	123	11
23925	HuNKG2A/huCD94	1,9E+05	4,2E-04	2,23	0,01
	HuNKG2C/huCD94	8,8E+03	6,0E-04	68	1
23566	HuNKG2A/huCD94	4,2E+05	1,1E-03	2,5	0,1
	HuNKG2C/huCD94	8,5E+03	8,3E-04	98	10
24135	HuNKG2A/huCD94	3,4E+05	1,3E-03	3,7	0,1
	HuNKG2C/huCD94	6,7E+03	9,8E-04	147	3
23765	HuNKG2A/huCD94	8,8E+04	1,3E-03	15,0	0,5
	HuNKG2C/huCD94	2,18E+03	1,56E-03	717	30
23686	HuNKG2A/huCD94	2,0E+05	1,4E-04	0,72	0,02
	HuNKG2C/huCD94	6,7E+05	2,6E-03	3,9	0,1

**Пример 4. *In vitro* связывание антител против NKG2A человека с клетками CHO-S, временно трансфицированными с NKG2A и NKG2C человека или яванского макака**

5 [0178] В этом примере описано связывание *in vitro* шести моноклональных антител против NKG2A человека с рецепторами NKG2A и NKG2C человека и яванского макака, экспрессируемыми на временно трансфицированных клетках CHO-S. Для сравнения были включены эталонные аналоги антител и изотипические контроли.

10 Материалы и способы

[0179] Клетки CHO-S временно трансфицировали конструкциями NKG2A человека и CD94 человека, NKG2C человека и CD94 человека, NKG2A яванского макака и CD94 яванского макака или конструкциями NKG2C яванского макака и CD94 яванского макака. Ложно-трансфицированные клетки CHO-S включали в анализ в качестве отрицательного контроля. Антитела тестировали на связывание с трансфицированными клетками в 3-кратных разведениях от 30 мкг/мл с уменьшением до 0,5 нг/мл антитела и 0 мкг/мл антитела, и инкубировали в течение 30 минут при 4<sup>0</sup> С. После этапа промывания клетки инкубировали с флуоресцентным вторичным антителом козы против человеческого IgG (H+L) (A-21445, Invitrogen) в течение 30 минут при 4<sup>0</sup> С в темноте. После второй промывки клетки тестировали с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии (скрининг IQue, Sartorius). Данные были перенесены в Excel, а графики построены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism<sup>®</sup>.

25 Результаты

[0180] На **ФИГ. 1** показаны кривые зависимости реакции от дозы антитела, связывающегося с NKG2A и NKG2C человека или яванского макака, экспрессируемые на временно трансфицированных клетках CHO-S. Все антитела прочно и дозозависимо связывались с NKG2A человека. Антитело 23686 связывало все четыре разные конструкции. Четыре антитела, 23566, 23925, 24135 и 24208, продемонстрировали очень слабое связывание с NKG2C человека. Антитело 23765 связывало NKG2A яванского макака, но лишь слабо связывало NKG2C человека и яванского макака. Аналог монализумаба связывал как NKG2A яванского макака, так и NKG2C яванского макака.

10

**Пример 5. *In vitro* блокирование связывания HLA-E с NKG2A и NKG2C антителами против NKG2A человека**

[0181] В этом примере описано *in vitro* блокирование шестью моноклональными антителами против NKG2A человека HLA-E, связывающихся с NKG2A и NKG2C человека и яванского макака, временно экспрессируемыми на клетках CHO-S. Для сравнения были включены эталонные аналоги антител и изотипический контроль.

15

Материалы и способы

[0182] Клетки CHO-S временно трансфицировали конструкциями для экспрессии NKG2A человека и CD94 человека, NKG2C человека и CD94 человека, NKG2A яванского макака и CD94 яванского макака или NKG2C яванского макака и CD94 яванского макака. Ложно-трансфицированные клетки CHO-S включали в анализ в качестве отрицательного контроля. PE-конъюгированный пентамер HLA-E тестировали на связывание с гетеродимерами в присутствии антител против человеческого NKG2A в 3-кратных серийных разведениях от 10 мкг/мл до 14 нг/мл антитела и 0 мкг/мл антитела. Антителам давали возможность связываться в течение 30 минут при 4° С перед добавлением пентамера HLA-E в разведении 1:50. Интенсивность флуоресценции связывания HLA-E с трансфицированными клетками измеряли с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии (скрининг IQue, Sartorius). Данные были перенесены в Excel, а графики построены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®.

20

25

30

Результаты

**[0183]** Как показано на **ФИГ. 2**, все антитела ингибировали связывание HLA-E с человеческим NKG2A дозозависимым образом (Панель А). Только антитело 23686 и аналог монализумаба (IgG<sub>4</sub>) полностью блокировали связывание HLA-E с NKG2A яванского макака (Панель В). Связывание HLA-E с человеческим NKG2C блокировалось антителом 23686, а с более низкой эффективностью - антителом 23566 (Панель С). Только аналог монализумаба (IgG<sub>4</sub>) и антитело 23686 полностью блокировали связывание HLA-E с NKG2C яванского макака (Панель D).

#### 10 **Пример 6. Связывание антител против NKG2A человека с эпитопами NKG2A**

**[0184]** В этом примере описано *in vitro* связывание моноклональных антител против NKG2A человека с различными гетеродимерами NKG2A/CD94, в которых один остаток из ECD NKG2A человека заменен на остаток NKG2C человека в соответствующем положении. Шесть различных конструкций, кодирующих гетеродимеры с одной аминокислотной заменой, и одну конструкцию, кодирующую гетеродимер с тремя аминокислотными заменами, временно трансфицировали в клетки CHO-S, при этом ложно-трансфицированные клетки CHO-S служили отрицательным контролем. Для сравнения были включены аналог эталонного антитела и антитело изотипического контроля.

#### Материалы и способы

**[0185]** Клетки CHO-S были временно трансфицированы конструкциями нуклеиновых кислот, кодирующими ECD NKG2A человека и CD94 человека с одной из следующих аминокислотных замен NKG2A: S167A, I168S, S170L, M189I, E197K, I225M или трижды замещенным S167A+I168S+S170L (соответствующие остаткам на рецепторе, которые являются частью сайта связывания HLA-E) (Kaiser et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(18):6696-701). На **ФИГ. 3** показаны четыре аминокислотные замены, выделенные в кристаллической структуре гетеродимера NKG2A/CD94 человека в комплексе с HLA-E (PDB: 3CDG).

**[0186]** Шесть антител против NKG2A человека тестировали на связывание с различными экспрессируемыми гетеродимерами. Антитела тестировали на связывание с трансфицированными клетками в 3-кратных



серийных разведениях от 1 мкг/мл антитела и 0 мкг/мл антитела и инкубировали в течение 30 минут при 4<sup>0</sup> С. После стадии промывания клетки инкубировали с флуоресцентным вторичным антителом козы против человеческого IgG (H+L) (A-21445, Invitrogen) в течение 30 минут при 4<sup>0</sup> С в темноте. После второй промывки клетки тестировали с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии (скрининг IQue, Sartorius). Данные были перенесены в Excel, а графики построены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism<sup>®</sup>. Для сравнения были включены эталонный аналог антитела и изотипический контроль.

## 10 Результаты

[0187] Как показано на **ФИГ. 4**, четыре антитела (23566, 23925, 24135 и 24208) показали пониженное связывание с гетеродимером с заменой NKG2A S170L, а также с гетеродимером с тройной заменой NKG2A (S167A, I168S, S170L). Это указывает на то, что связывание этих четырех антител с человеческим NKG2A зависит по меньшей мере от остатка S170. Снижение связывания для 23925 и 24208 было больше для тройной замены, чем для одиночной замены S170L, что указывает на дополнительное влияние одновременных мутаций S167A и I168S. Антитело 23765 и аналог монализумаба показали пониженное связывание с гетеродимером с заменой NKG2A E197K, демонстрируя необходимость глутаминовой кислоты в положении 197 для правильного связывания этих двух антител с человеческим NKG2A. Монализумаб также показал снижение связывания с гетеродимером с заменой M189I, что указывает на некоторое влияние метионина в положении 189.

## 25 **Пример 7. Скрининг антител против NKG2A при опосредованном NK-клетками уничтожении клеток K562-HLA-E**

[0188] Панель антител против NKG2A оценивали на способность усиливать уничтожение клеток хронического миелолейкоза K562, трансфицированных HLA-E (K562-HLA-E) линией NK-клеток NK-92 или первичными NK-клетками от здорового донора.

## Материалы и способы

[0189] Клетки K562-HLAE были нагружены пептидом HLA-B\*0701, а клетки NK-92 не получали IL-2 в течение ночи. На следующий день NK-клетки выделяли от здорового донора и антитела против NKG2A инкубировали в

концентрации 25 мкг/мл с НК-92 или первичными НК-клетками с последующим добавлением нагруженных кальцеином клеток-мишеней K562-HLA-E и инкубацией в течение 90 минут. Убивающую способность НК-92 или первичных НК-клеток измеряли по высвобождению кальцеина в супернатант.

5 Специфический лизис рассчитывали путем вычитания спонтанного лизиса (только нагруженные кальцеином клетки K562-HLA-E) и нормализации к максимальному лизису (лизис Triton X-100 нагруженных кальцеином клеток K562-HLA-E).

#### Результаты

10 **[0190]** На **ФИГ. 5** показан специфический лизис клеток K562-HLA-E после обработки панелью антител против NKG2A. Очевидно, что уровень лизиса после обработки различными антителами против NKG2A сильно различался, показывая, что некоторые антитела не имели функциональности в этом анализе, тогда как другие антитела сильно усиливали уничтожение клеток K562-HLA-E и  
15 до более высокого уровня, чем аналог моноклонального антитела (IgG<sub>4</sub>) (Панели А и В). Положительная корреляция наблюдалась между уровнями уничтожения с использованием НК-92 и первичных НК-клеток (Панель С).

**Пример 8. Функциональная активность антител против NKG2A  
20 человека при опосредованном клетками НК-92 уничтожении клеток K562-  
HLA-E**

**[0191]** В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* нескольких антител против NKG2A (24208, 23925, 23566, 23765, 23686) с целью демонстрации дозозависимой антагонистической активности. Антитела  
25 оценивали на их способность усиливать опосредованное клетками НК-92 уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E (K562-HLA-E). Для сравнения был включен аналог моноклонального антитела (IgG<sub>4</sub>).

#### Материалы и способы

**[0192]** Клетки K562-HLA-E были нагружены пептидом HLA-B\*0701, а  
30 клетки НК-92 не получали IL-2 в течение ночи. На следующий день клетки НК-92 и антитела против NKG2A инкубировали с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл, с последующим добавлением нагруженных кальцеином клеток-мишеней K562-HLA-E и инкубацией в течение 90 минут. Убивающую способность клеток НК-92 измеряли по высвобождению

кальцеина в супернатант. Специфический лизис рассчитывали путем вычитания спонтанного лизиса (только нагруженные кальцеином клетки 562-HLA-E) и нормализации к максимальному лизису (лизис Triton X-100 нагруженных кальцеином клеток K562-HLA-E).

5 Результаты

[0193] Уничтожение клеток K562-HLA-E при обработке антителами против NKG2A показано на **ФИГ. 6**. Несколько антител против NKG2A показали более высокую активность по сравнению с аналогом монализумаба.

10 **Пример 9. Функциональная активность антител против NKG2A человека при опосредованном первичными НК-клетками уничтожении клеток K562-HLA-E**

[0194] В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* нескольких антител против NKG2A (24208, 23925, 23566, 23765, 23686) с целью демонстрации дозозависимой антагонистической активности. Антитела оценивали на их способность усиливать опосредованное первичными НК-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E (K562-HLA-E). Для сравнения был включен аналог монализумаба (IgG<sub>4</sub>).

Материалы и способы

20 [0195] Клетки K562-HLA-E были нагружены пептидом HLA-B\*0701, а первичные НК-клетки были выделены из свежих PBMC здоровых доноров. На следующий день первичные НК-клетки и антитела против NKG2A инкубировали с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл, с последующим добавлением нагруженных кальцеином клеток-мишеней K562-HLA-E (1:10 соотношение E:T) и инкубацией в течение 90 минут. Убивающую способность первичных НК-клеток измеряли по высвобождению кальцеина в супернатант. Специфический лизис рассчитывали путем вычитания спонтанного лизиса (только нагруженные кальцеином клетки 562-HLA-E) и нормализации к максимальному лизису (лизис Triton X-100 нагруженных кальцеином клеток K562-HLA-E).

Результаты

[0196] Уничтожение клеток K562-HLA-E при обработке антителами против NKG2A показано на **ФИГ. 7**. Некоторые антитела против NKG2A

показали более высокую активность по сравнению с аналогом монализумаба (IgG<sub>4</sub>).

**Пример 10. Функциональная активность антител против NKG2A человека при опосредованном  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожении клеток K562-HLA-E**

[0197] В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* выбранных антител против NKG2A с целью демонстрации дозозависимой антагонистической активности. Антитела оценивали на их способность усиливать опосредованное  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E (K562-HLA-E). Для сравнения был включен аналог монализумаба (IgG<sub>4</sub>).

Материалы и способы

[0198] Клетки K562-HLA-E были нагружены пептидом HLA-B\*0701, и были выделены  $\gamma\delta$  Т-клетки NKG2A<sup>+</sup>. На следующий день  $\gamma\delta$  Т-клетки NKG2A<sup>+</sup> и антитела против NKG2A инкубировали с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл, с последующим добавлением нагруженных кальцеином клеток-мишеней K562-HLA-E и инкубацией в течение 3 часов. Убивающую способность  $\gamma\delta$  Т-клеток измеряли по высвобождению кальцеина в супернатант. Специфический лизис рассчитывали путем вычитания спонтанного лизиса (только нагруженные кальцеином клетки K562-HLA-E) и нормализации к максимальному лизису (лизис Triton X-100 нагруженных кальцеином клеток K562-HLA-E).

Результаты

[0199] Уничтожение клеток K562-HLA-E при обработке антителами против NKG2A показано на **ФИГ. 8**. Несколько антител против NKG2A показали более высокую активность, чем аналог монализумаба.

**Пример 11. EC<sub>50</sub> и эффективность уничтожения раковых клеток**

[0200] В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* антитела против NKG2A 24208 с целью демонстрации цитотоксической активности. Антитела оценивали на предмет их способности усиливать опосредованное первичными NK-клетками уничтожение клеток K562 человека,

трансфицированных HLA-E (K562-HLA-E). Аналог монализумаба (IgG<sub>4</sub>) и два аналога BMS, BMS-NKG2A.9 (HC: SEQ ID NO: 65, LC: SEQ ID NO: 66) и BMS-NKG2A.11 (HC: SEQ ID NO: 65, LC: SEQ ID NO: 67) были включены для сравнения.

#### 5 Материалы и способы

[0201] Клетки K562-HLA-E были нагружены пептидом HLA-B\*0701, а первичные NK-клетки человека не получали IL2 в течение ночи. На следующий день первичные NK-клетки человека и антитела против NKG2A инкубировали с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 50 мкг/мл, с  
10 последующим добавлением нагруженных кальцеином клеток-мишеней K562-HLA-E и инкубацией в течение 90 минут. Убивающую способность первичных NK-клеток человека измеряли по высвобождению кальцеина в супернатант. Специфический лизис рассчитывали путем вычитания спонтанного лизиса (только нагруженные кальцеином клетки K562-HLA-E) и нормализации к  
15 максимальному лизису (лизис Triton X-100 нагруженных кальцеином клеток K562-HLA-E).

#### Результаты

[0202] Уничтожение клеток K562-HLA-E после обработки антителами против NKG2A показано в Таблице 8 и на **ФИГ. 9**. Антитело 24208 против  
20 NKG2A показало превосходную активность по сравнению с аналогом монализумаба и аналогами BMS-NKG2A.9 и BMS-NKG2A.11.

**Таблица 8: Краткие сведения по индуцированной цитотоксичности NK-клеток (EC<sub>50</sub>)**

25

EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	24208 (IgG <sub>1</sub> LALA) (n=19)	Монализумаб (IgG <sub>4</sub> ) (n=6)	BMS NKG2A.9 (IgG <sub>1</sub> .3f) (n=7)	BMS NKG2A.11 (IgG <sub>1</sub> .3f) (n=6)
среднее	0,19	0,89	1,07	0,71
диапазон	0,04-1,05	0,24-3,16	0,71-4,50	0,40-4,41

**Пример 12. Опосредованное NK-клетками уничтожение, индуцированное антителом 24208 в выбранных клеточных линиях, экспрессирующих эндогенный HLA-E**

[0203] В этом примере описывается экспрессия эндогенного HLA-E на поверхности линий опухолевых клеток (HT-29, CCRF-CEM, A253, Detroit 562, CAL-120, FaDu) и влияние антитела 24208 на опосредованное NK-клетками уничтожение этих линий опухолевых клеток *in vitro*.

5 Материалы и способы

[0204] Экспрессию эндогенного HLA-E в шести различных клеточных линиях (HT-29, CCRF-CEM, A253, Detroit 562, CAL-120 и FaDu) исследовали методом проточной цитометрии. Выделенные первичные NK-клетки человека от здоровых людей совместно культивировали с шестью различными мечеными кальцеином клетками-мишенями, экспрессирующими эндогенный HLA-E (нагруженными пептидом HLA-B\*0701) в соотношении 10:1, и обрабатывали одной концентрацией антитела 24208 или изотипического контроля (IgG<sub>1</sub> LALA). Высвобождение кальцеина измеряли через 1,5 часа и рассчитывали процент специфического лизиса.

15 Результаты

[0205] Было показано, что все шесть линий опухолевых клеток человека экспрессируют эндогенный HLA-E на поверхности (ФИГ. 10, Панель А). Лечение антителом 24208 индуцировало NK-опосредованное уничтожение этих линий опухолевых клеток по сравнению с лечением с IgG<sub>1</sub> LALA (ФИГ. 10, Панель В).

**Пример 13. Высвобождение MIP-1 $\beta$  в совместных культурах NK-раковых клеток**

[0206] В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* антитела против NKG2A 24208 с целью демонстрации цитотоксической активности. Антитела оценивали на их способность индуцировать секрецию провоспалительного цитокина Макрофаг-воспалительный белок-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) при совместном культивировании первичных NK-клеток NKG2A<sup>+</sup> человека с любой из линий раковых клеток A549 и JIMT-1.

30 Материалы и способы

[0207] Первичные NK-клетки NKG2A<sup>+</sup> человека инкубировали с двукратным титрованием 24208 или IgG<sub>1</sub> LALA (начиная с 50 мкг/мл) и культивировали со стабильными раковыми клетками, экспрессирующими HLA-E, трансдуцированными HLAЕ-тримером. Через 48 часов совместного

культивирования концентрации MIP-1 $\beta$  в супернатантах совместной культуры измеряли с помощью ELISA.

#### Результаты

5 [0208] Концентрация MIP-1 $\beta$  в супернатантах совместной культуры при совместном культивировании клеток-тримера HLAЕ А549 или клеток-тримера HLAЕ JIMT-1 с первичными НК-клетками человека, обработанными LALA 24208 или IgG<sub>1</sub>, показана на **ФИГ. 11**. Антитело против NKG2A 24208 продемонстрировало более высокую индукцию MIP-1 $\beta$  по сравнению с контрольным антителом IgG<sub>1</sub> LALA.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, при этом антитело связывается с тем же эпитопом человеческого NKG2A, что и антитело,  
5 содержащее:

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

10 б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

15 г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

д) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и  
20 62; или

е) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

25 2. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в которых

а) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

30 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, соответственно;

ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;



- iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;  
или
  - iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61; и
- 5 б) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно;
  - ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;
  - iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;  
или
  - iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности
- 15 SEQ ID NO: 4 и 62.
3. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в которых
- a) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- 20 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15-17, соответственно;
- ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
- 25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;
- iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;  
или
  - iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61; и
- 30 б) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20, соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;  
5 или

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62.

4. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в  
10 которых

a) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

15 ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;  
или

20 iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61; и

b) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно;

25 ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;  
30 или

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62.

5. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в которых

а) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

5     i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-37, соответственно;

10     ii) варибельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

10     iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

10     iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

15     i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40, соответственно;

20     ii) варибельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

20     iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

25     iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62.

6. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в которых

а) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:

30     i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

30     ii) варибельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

- iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;  
или
  - iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61; и
- 5 б) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-50, соответственно;
  - ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;
  - iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44;  
или
  - iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности
- 15 SEQ ID NO: 44 и 62.
7. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 1, в которых
- a) тяжелая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- 20 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55-57, соответственно;
- ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
- 25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;
- iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;  
или
  - iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61; и
- 30 б) легкая цепь указанного антитела против NKG2A содержит:
- i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-60, соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

5 или  
iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

10 8. Антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, при этом указанное антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- 15 а) SEQ ID NO: 5-10, соответственно;  
б) SEQ ID NO: 15-20, соответственно;  
в) SEQ ID NO: 25-30, соответственно;  
г) SEQ ID NO: 35-40, соответственно;  
д) SEQ ID NO: 45-50, соответственно; или  
е) SEQ ID NO: 55-60, соответственно.

20 9. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 8, при этом указанное антитело содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям:

- 25 а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;  
б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;  
в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;  
г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;  
д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или  
е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

30 10. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 8, при этом указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;  
б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;  
в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;  
г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;  
5 д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или  
е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

11. Антитело против NKG2A по любому из п.п. 1-10, при этом антитело представляет собой IgG.

10

12. Антитело против NKG2A по п. 11, при этом антитело представляет собой IgG<sub>1</sub>.

15

13. Антитело против NKG2A по любому из п.п. 1-12, при этом антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в F<sub>C</sub> области.

20

14. Антитело против NKG2A по любому из п.п. 1-10, при этом антитело представляет собой IgG<sub>1</sub> и содержит мутацию в одном или нескольких положениях аминокислот тяжелой цепи 234 и 235, которые пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT<sup>®</sup>.

15. Антитело против NKG2A по п. 14, в котором один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 мутированы с Leu на Ala.

25

16. Антитело против NKG2A, которое содержит:

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

30

б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

г) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

д) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

е) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

10

17. Антитело против NKG2A или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с эпитопом NKG2A человека, содержащим аминокислотный остаток S170.

15 18. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 17, при этом указанный эпитоп дополнительно содержит аминокислотные остатки S167 и I168.

19. Антитело против NKG2A по п. 17 или 18, при этом указанный эпитоп не содержит аминокислотный остаток E197, M189 или оба.

20

20. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по любому из п.п. 1-19, при этом антитело или антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере одним свойством, выбранным из таких как:

25 а) связывается с NKG2A человека с  $K_D$  15 нМ или менее, измеренным методом поверхностного плазмонного резонанса;

б) связывается с NKG2A человека, экспрессируемым на клетках CHO-S;

в) блокирует связывание HLA-E с гетеродимером NKG2A/CD94 человека, экспрессируемым на клетках CHO-S;

30 г) усиливает опосредованное клетками NK-92 уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E;

д) усиливает опосредованное первичными NK-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E;

е) усиливает опосредованное  $\gamma\delta$  Т-клетками уничтожение клеток K562, трансфицированных HLA-E; и

ё) связывается с другим эпитопом на NKG2A человека, чем монализумаб.

5

21. Антитело против NKG2A или антигенсвязывающая часть по п. 20, при этом антитело или антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или всеми указанными свойствами.

10 22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против NKG2A или антигенсвязывающую часть по любому из п.п. 1-21 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

15 23. Фармацевтическая композиция по п. 22, дополнительно содержащая иммуностимулирующий агент, вакцину, химиотерапевтический агент, противоопухолевый агент, антиангиогенный агент или ингибитор тирозинкиназы.

20 24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, или нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, или и ту, и другую, антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому из п.п. 1-21.

25 25. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 24, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51 и 52.

30 26. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 24 или 25, при этом указанный вектор дополнительно содержит последовательность контроля экспрессии.



27. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, и нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому из п.п. 1-21.

5

28. Способ получения антитела против NKG2A или его антигенсвязывающей части, включающий предоставление клетки-хозяина по п. 27, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его части, и выделение полученного антитела или части.

10

29. Биспецифическая связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен одного или двух различных антител против NKG2A по любому из п.п. 1-21.

15

30. Способ применения антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому из п.п. 1-21, фармацевтической композиции по п. 22 или 23, или биспецифической связывающей молекулы по п. 29 в диагностическом процессе.

20

31. Способ усиления иммунной активности у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому из п.п. 1-21, фармацевтической композиции по п. 22 или 23, или биспецифической связывающей молекулы по п. 29.

25

32. Способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому из п.п. 1-21, фармацевтической композиции по п. 22 или 23, или биспецифической связывающей молекулы по п. 29.

30

33. Способ по п. 32, при котором рак находится в ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легких, кишечника, толстой кишки, яичников,

головного мозга, предстательной железы, почек, мягких тканей, системы кроветворения, головы и шеи, печени, костей, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки, шейки матки и поджелудочной железы.

5           34. Способ по любому из п.п. 31-33, при котором пациент имеет рак  
головой и шеи, рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак  
пищевода, острый миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз,  
миелодиспластический синдром, множественную миелому, хронический  
лимфоидный лейкоз, хронический миелолейкоз, миелопролиферативное  
10 новообразование, лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

          35. Способ по любому из п.п. 31-34, дополнительно включающий  
введение пациенту иммуностимулирующего средства, вакцины,  
химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства,  
15 антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы или проведение лучевой  
терапии.

          36. Способ лечения иммунного расстройства у пациента, нуждающегося в  
этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного  
20 количества антитела против NKG2A или антигенсвязывающей части по любому  
из п.п. 1-21, фармацевтической композиции по п. 22 или 23, или  
биспецифической связывающей молекулы по п. 29.

          37. Применение антитела или антигенсвязывающей части по любому из  
25 п.п. 1-21, фармацевтической композиции по п. 22 или 23, или биспецифической  
связывающей молекулы по п. 29 для изготовления лекарственного средства для:  
а) повышения иммунной активности у пациента;  
б) лечения рака у пациента; или  
в) лечения иммунного расстройства у пациента,  
30 по способу по любому из п.п. 31-36.

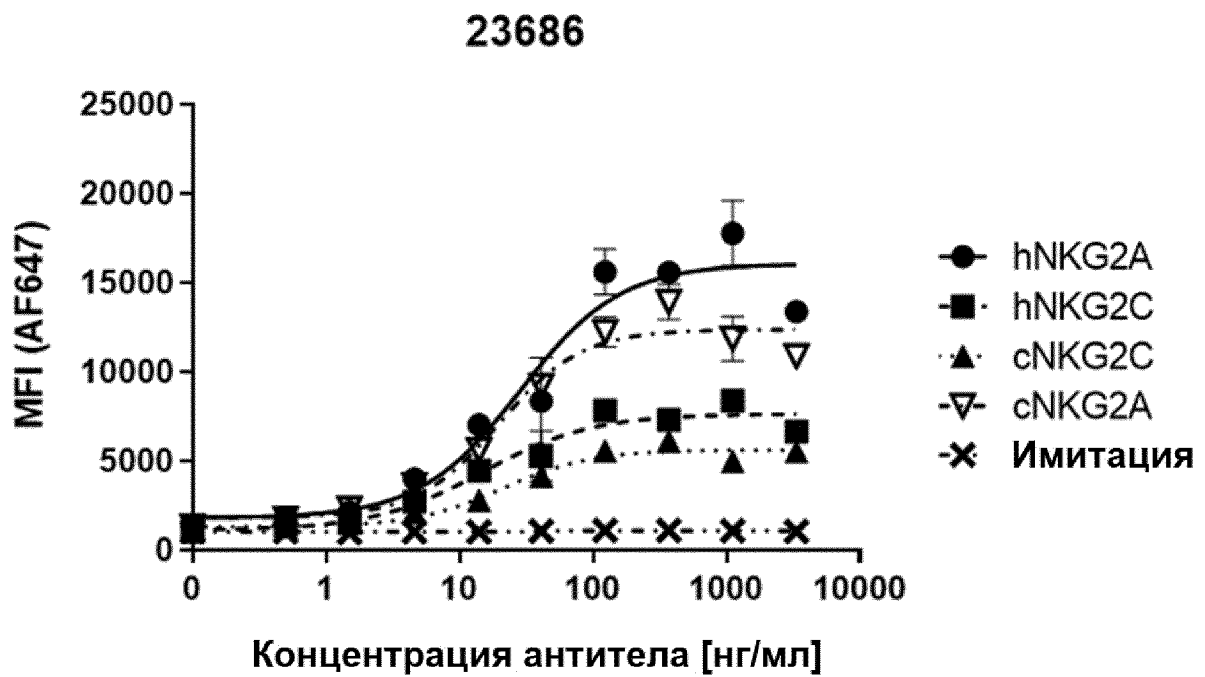
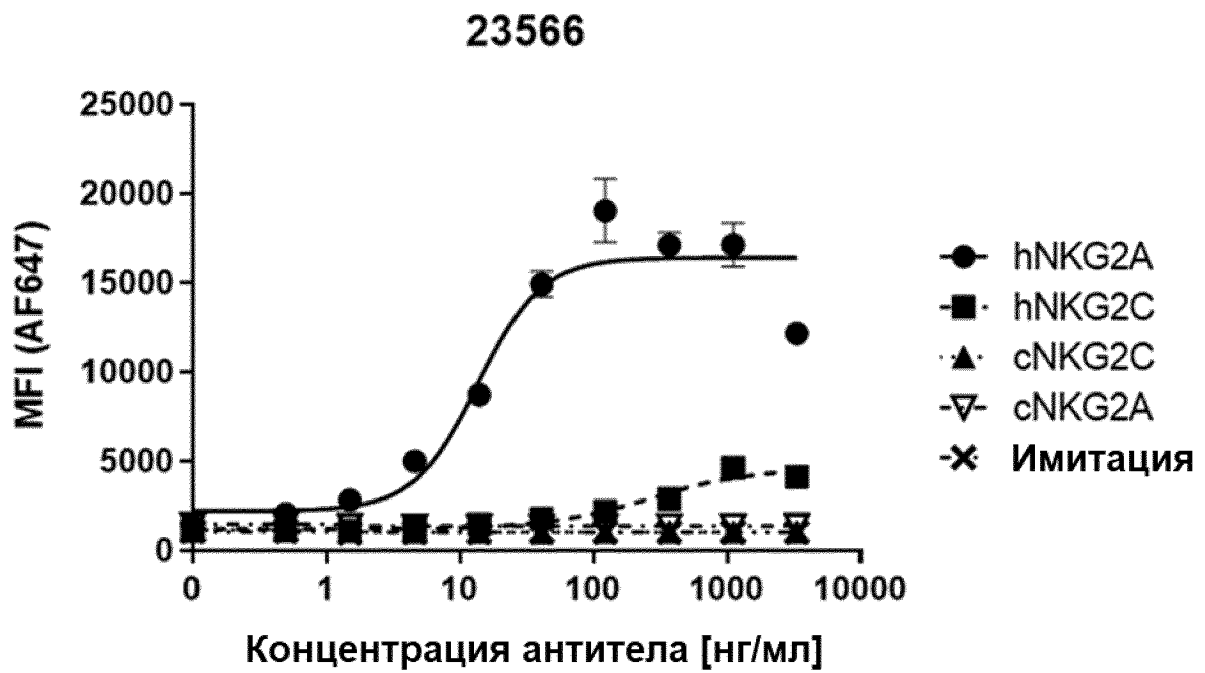
          38. Антитело или антигенсвязывающая часть по любому из п.п. 1-21,  
фармацевтическая композиция по п. 22 или 23, или биспецифическая  
связывающая молекула по п. 29, для применения в:

- а) повышении иммунной активности у пациента;
  - б) лечении рака у пациента; или
  - в) лечении иммунного расстройства у пациента,
- по способу по любому из п.п. 31-36.

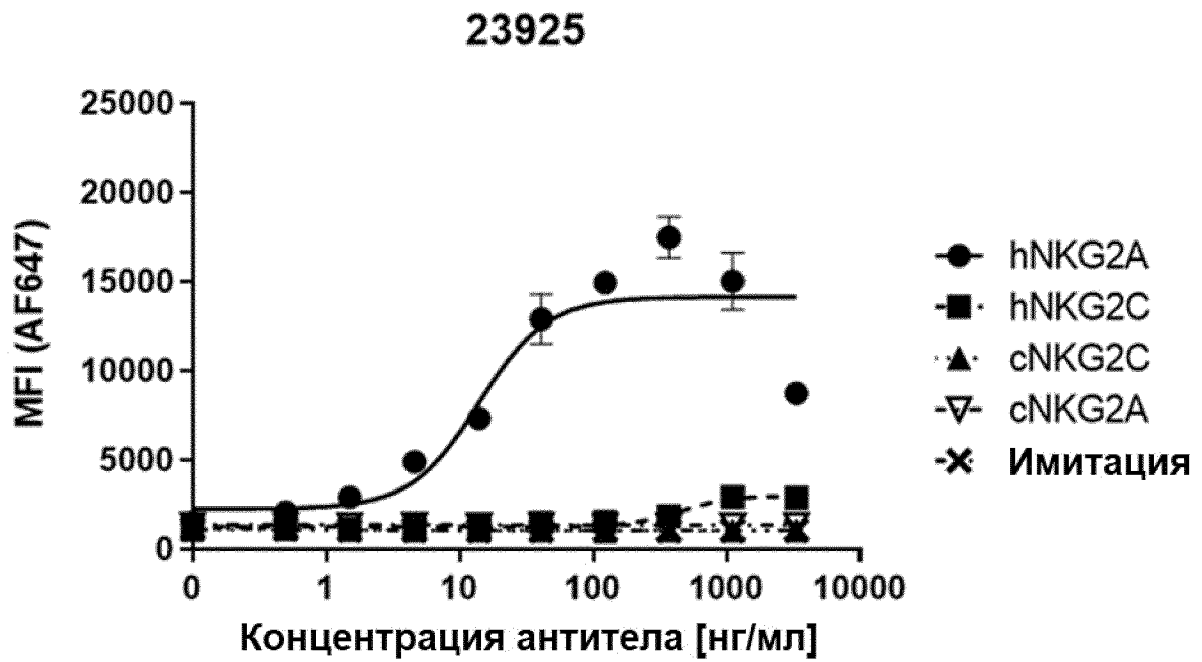
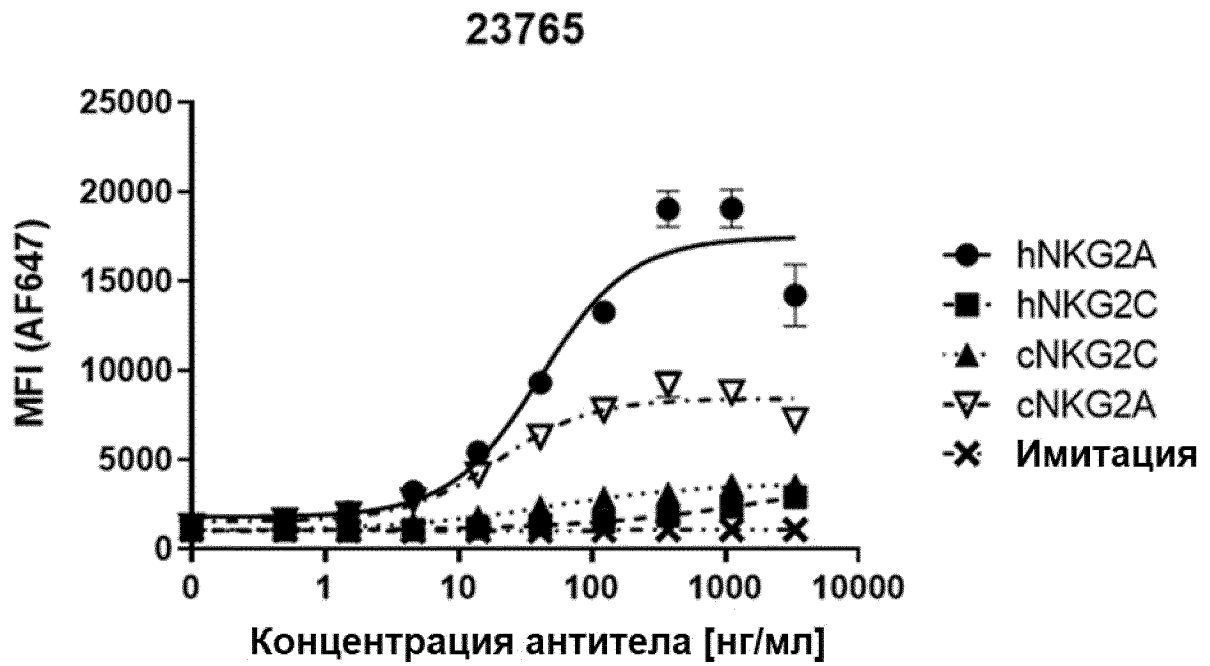
5

39. Способ по любому из п.п. 31-36; применение по п. 37; или антитело или антигенсвязывающая часть для применения, фармацевтическая композиция для применения или биспецифическая связывающая молекула для применения по п. 38, при этом пациентом является человек.

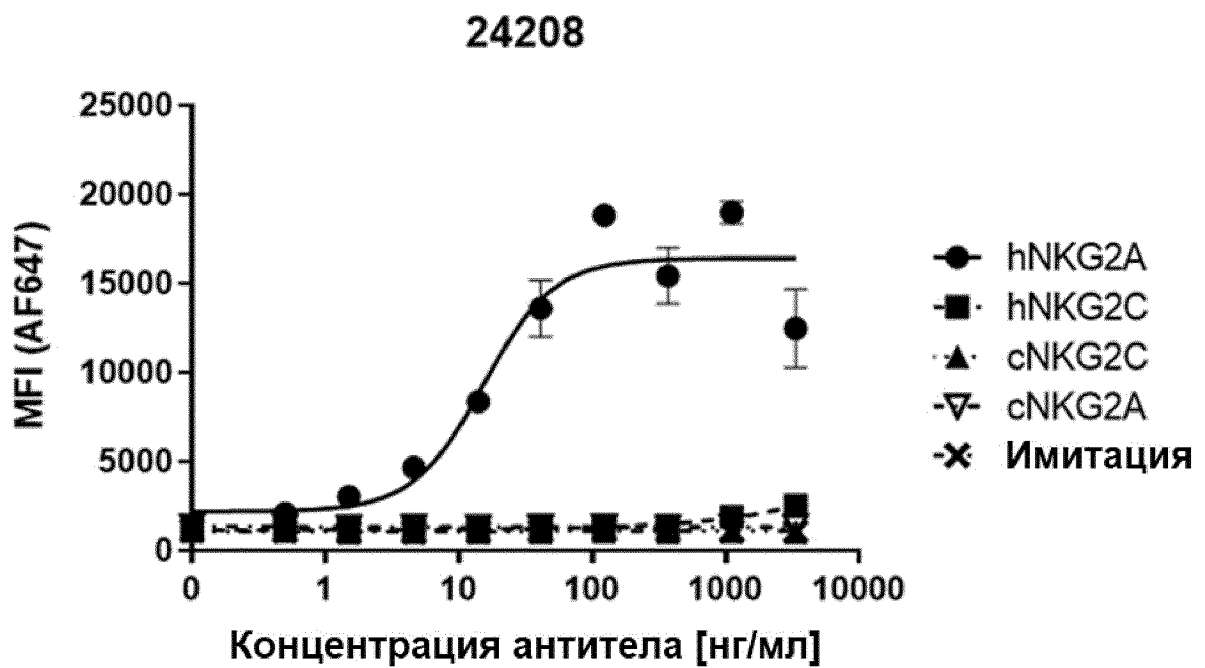
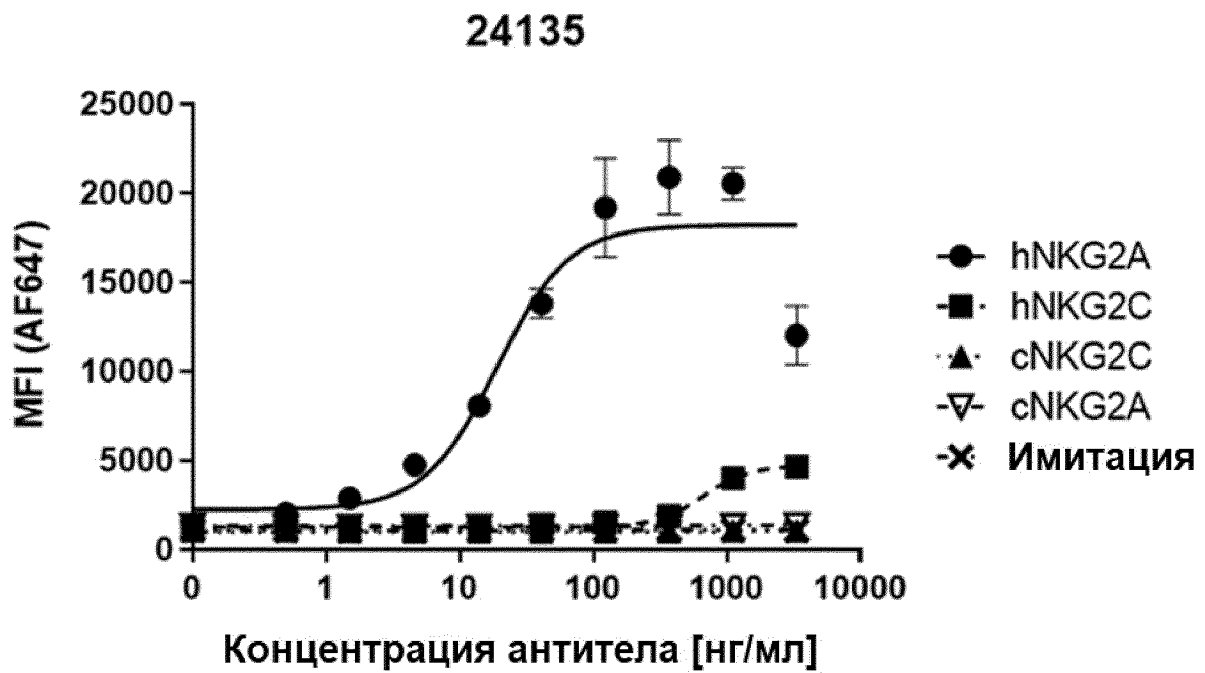
10



ФИГ. 1

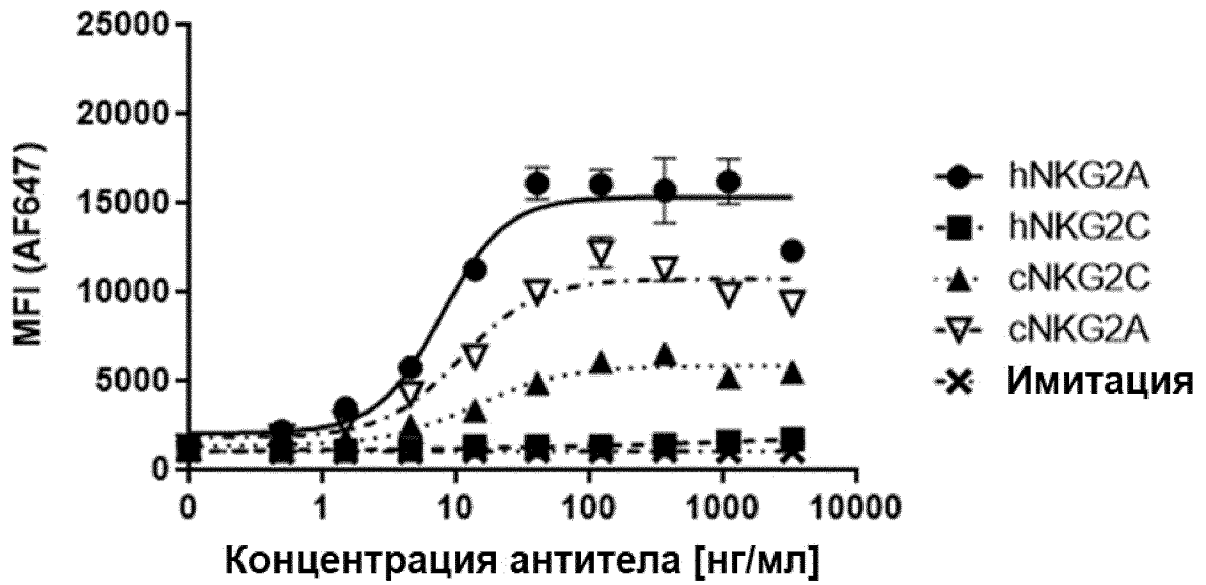


ФИГ. 1 (продолж.)

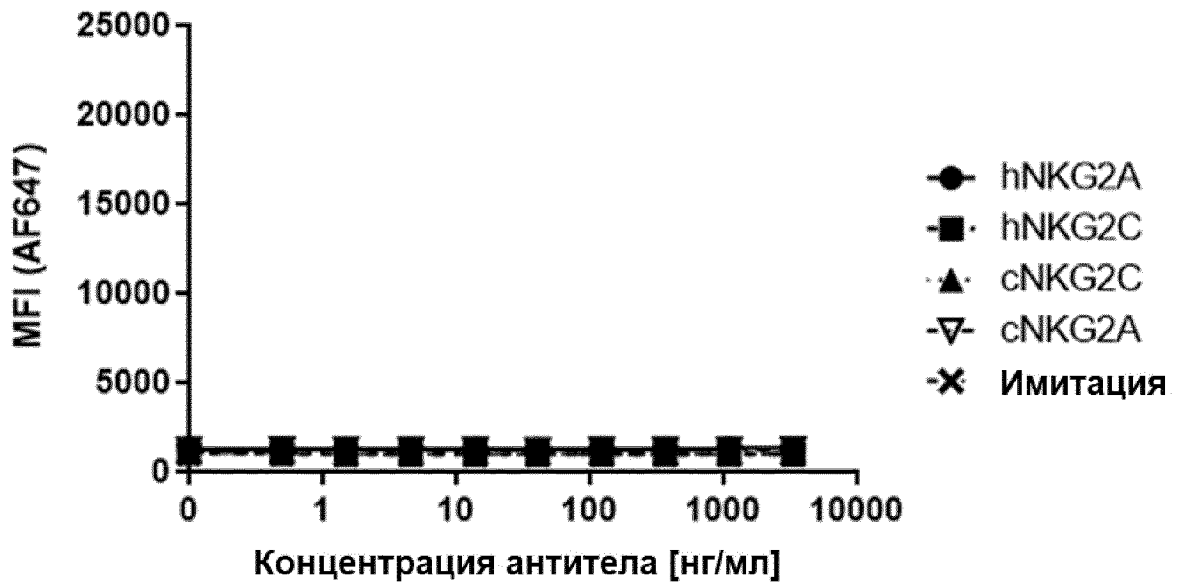


ФИГ. 1 (продолж.)

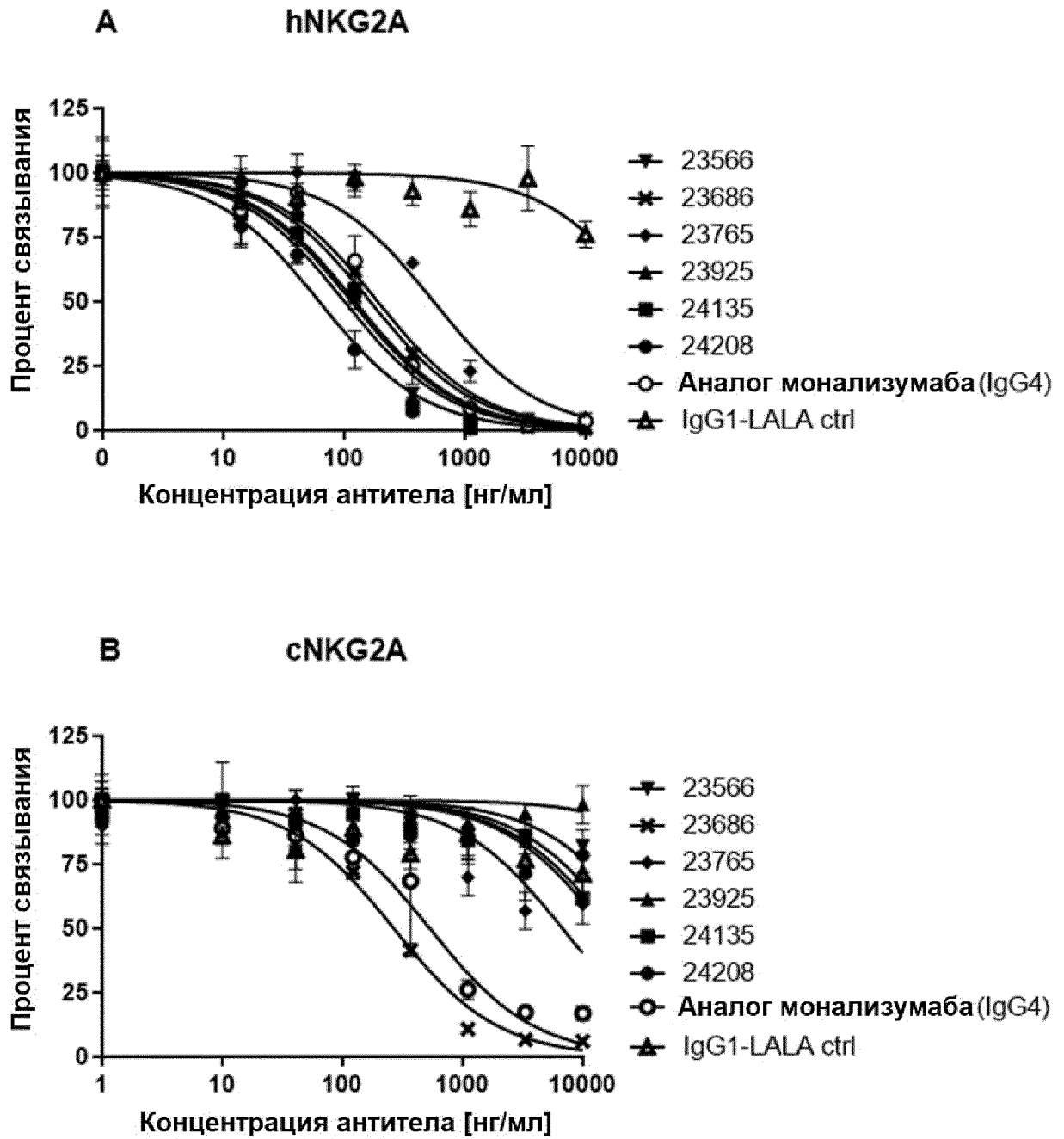
### Аналог монализумаба (IgG1-LALA)



### IgG1-LALA ctrl

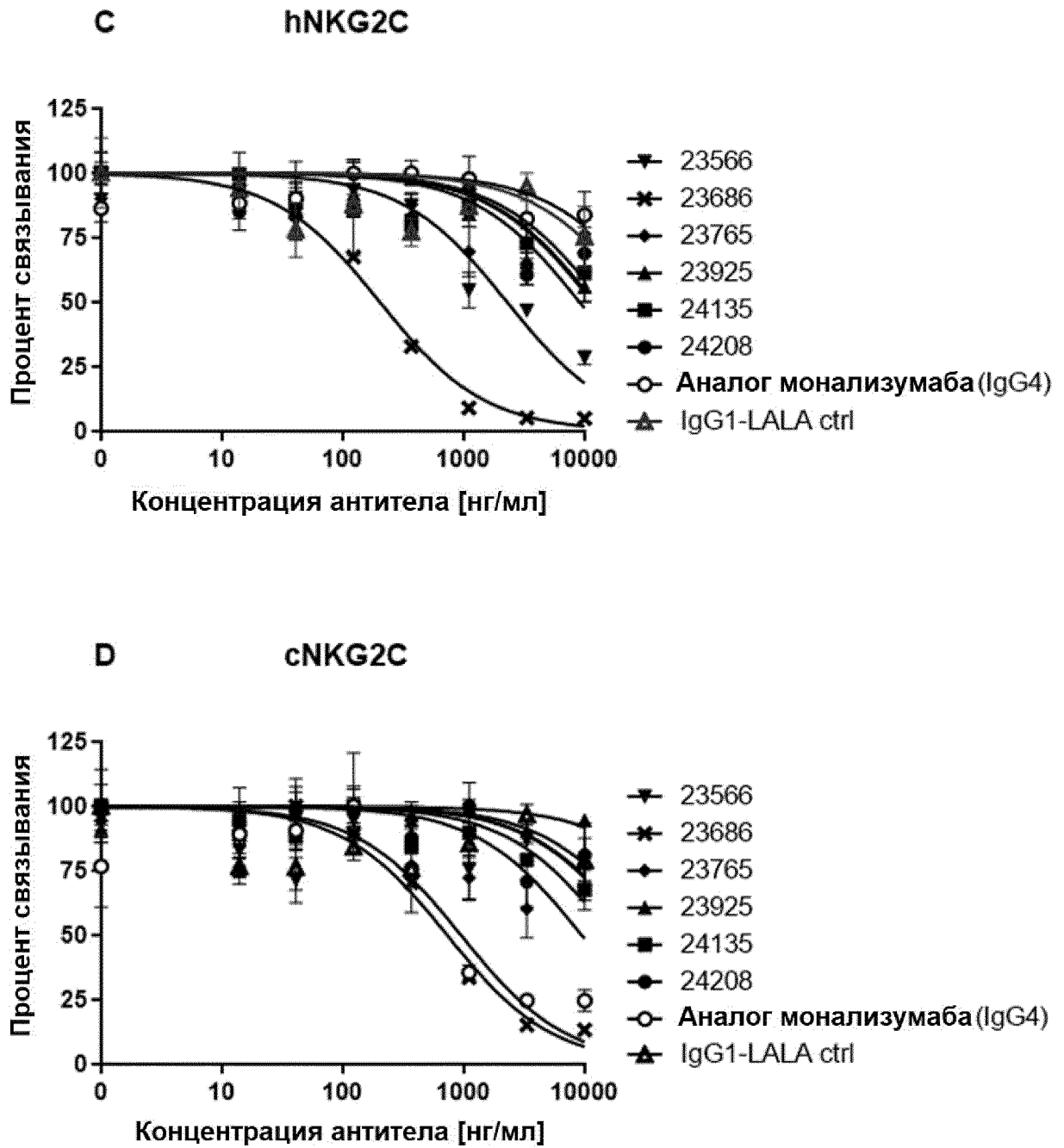


ФИГ. 1 (продолж.)

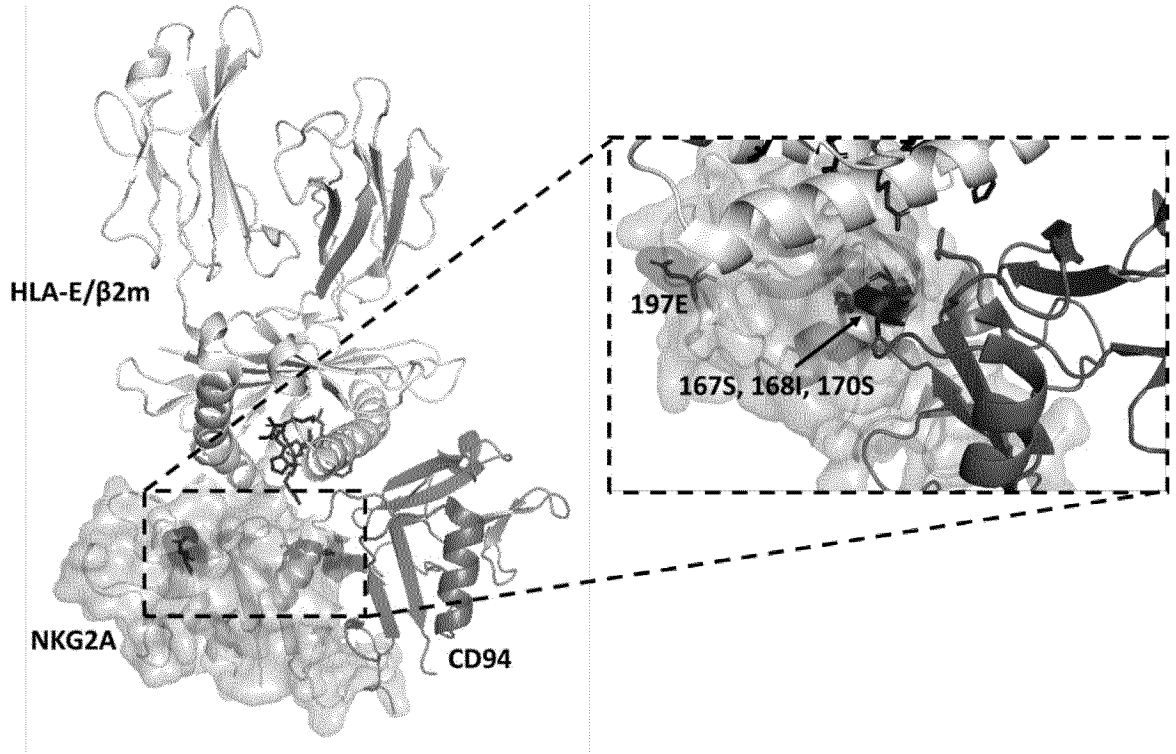


ФИГ. 2 (продолж.)



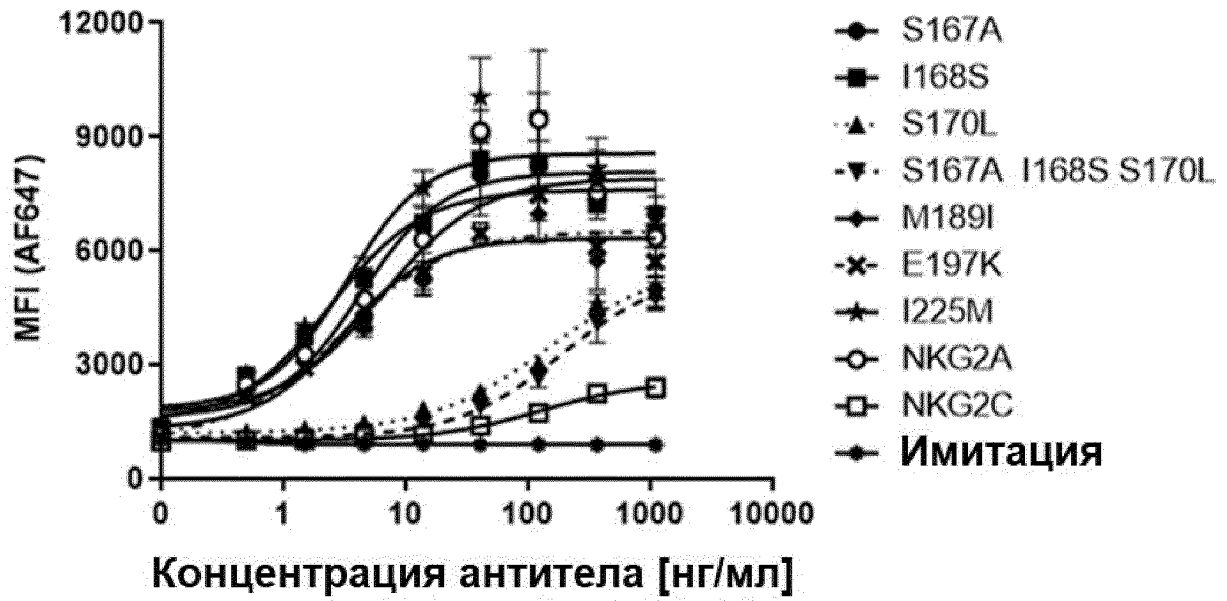


ФИГ. 2 (продолж.)

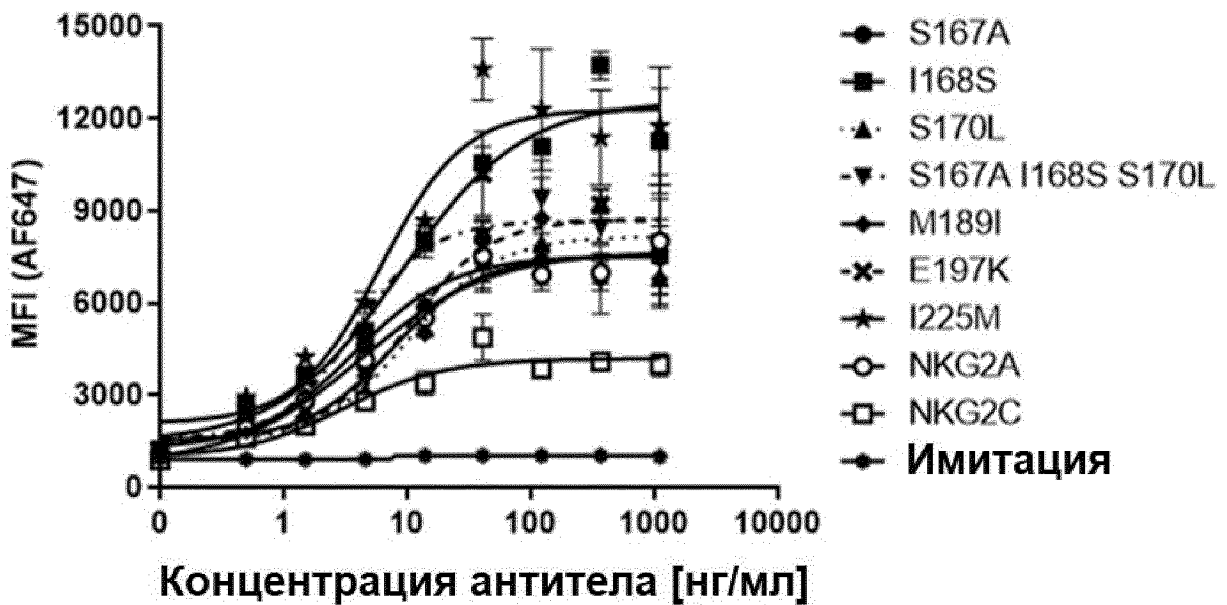


ФИГ. 3

23566

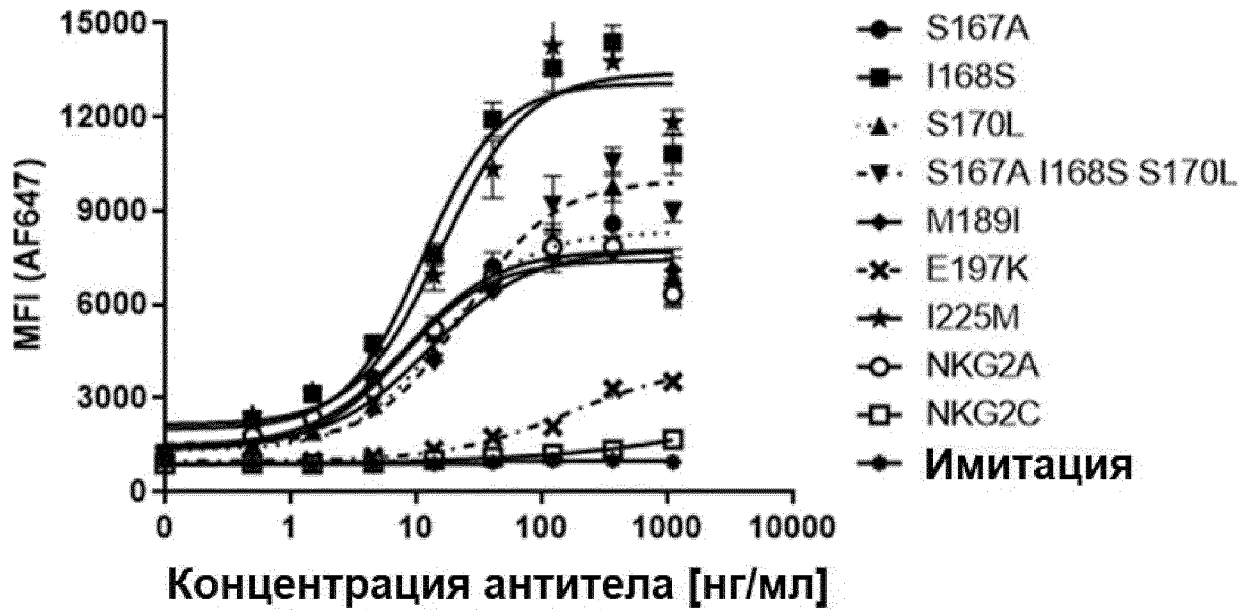


23686

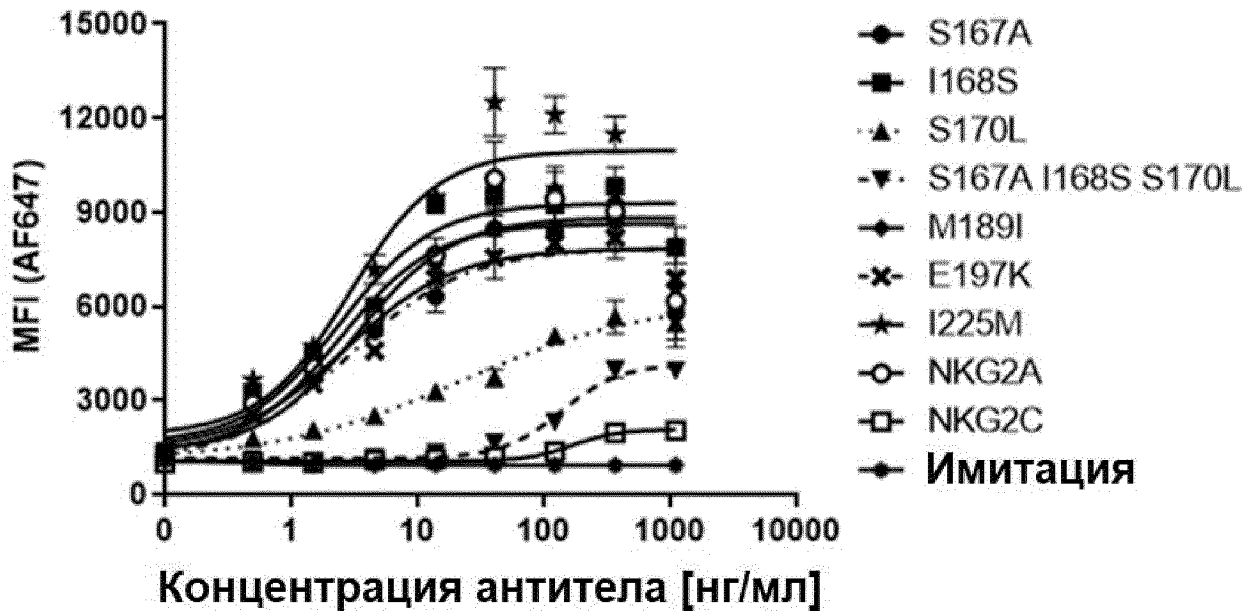


ФИГ. 4

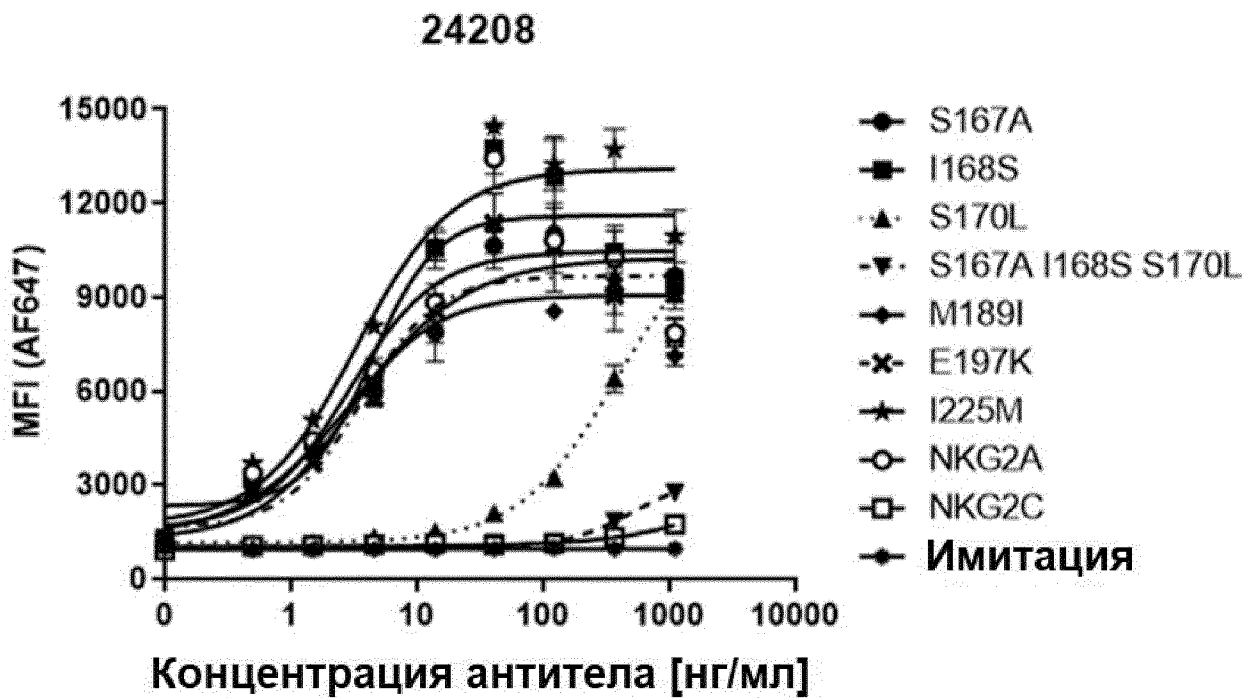
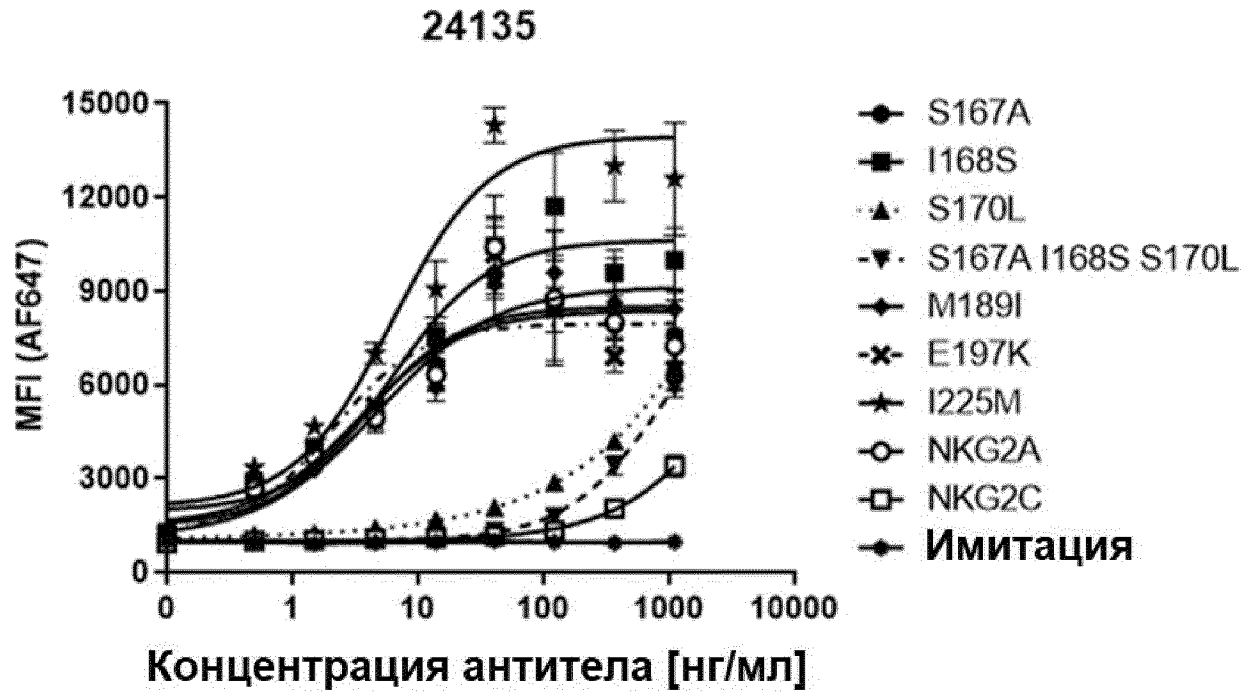
23765



23925

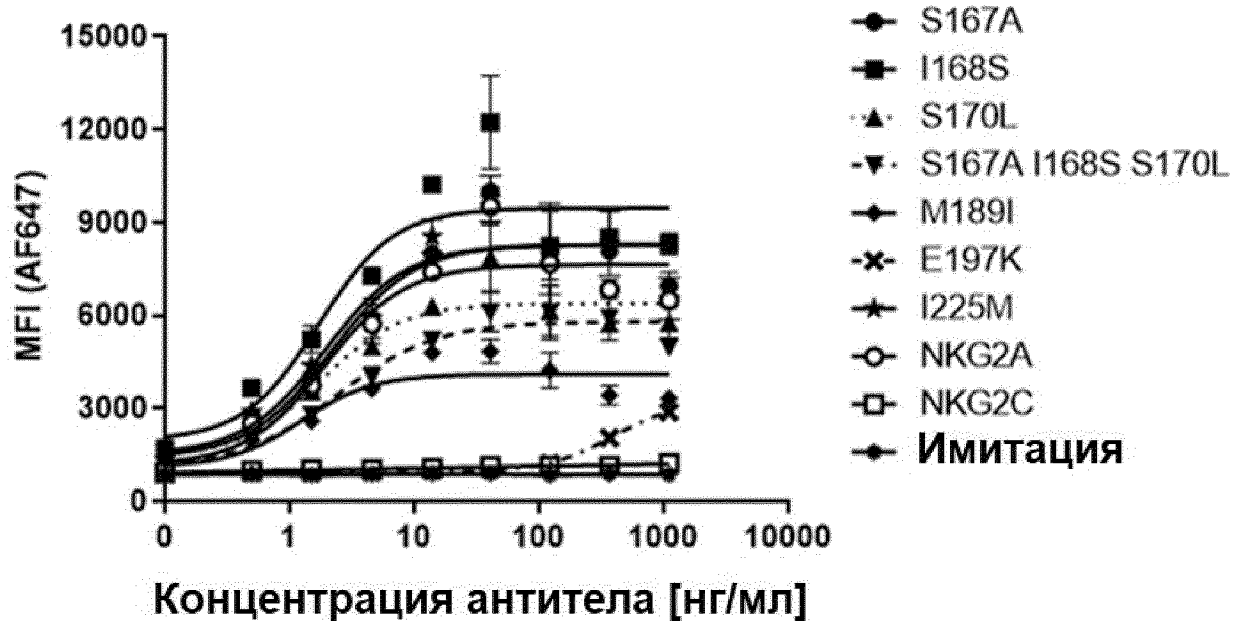


ФИГ. 4 (продолж.)

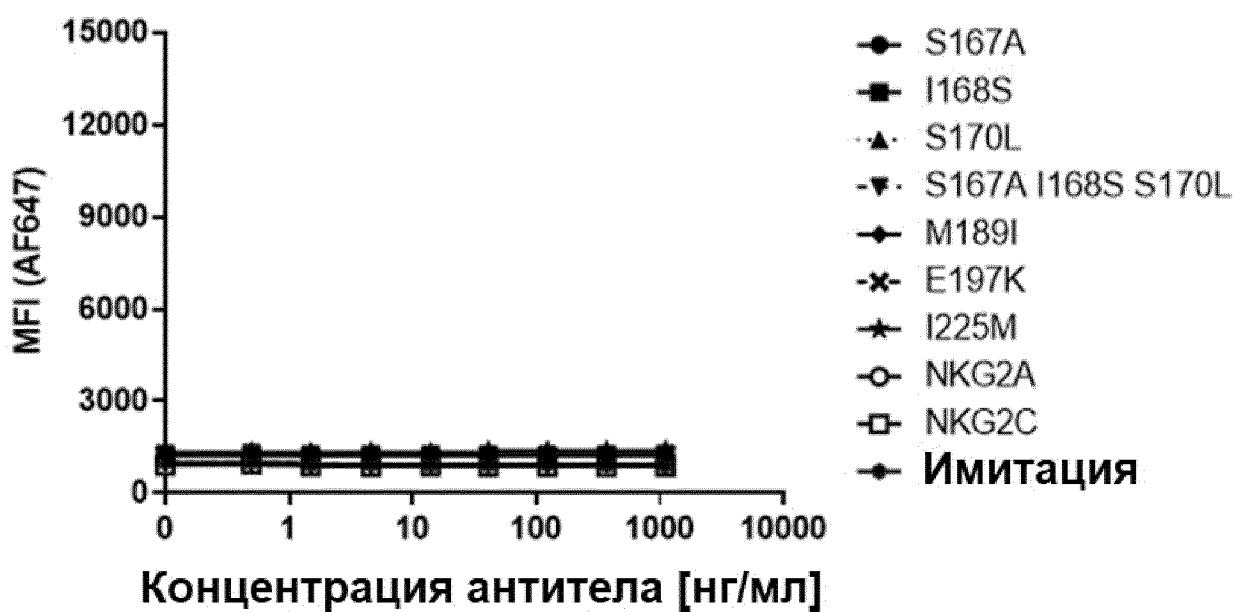


ФИГ. 4 (продолж.)

### Аналог монализумаба (IgG4)

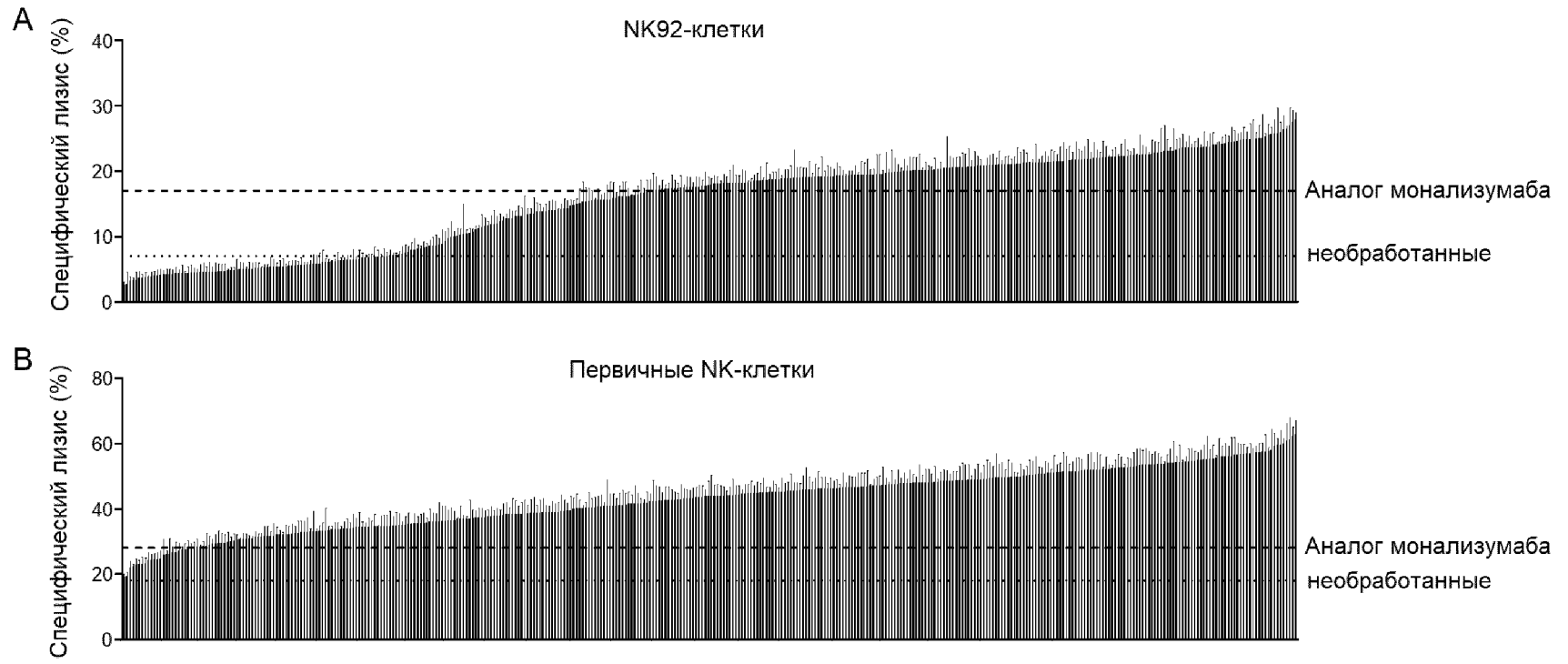


### IgG1-LALA ctrl

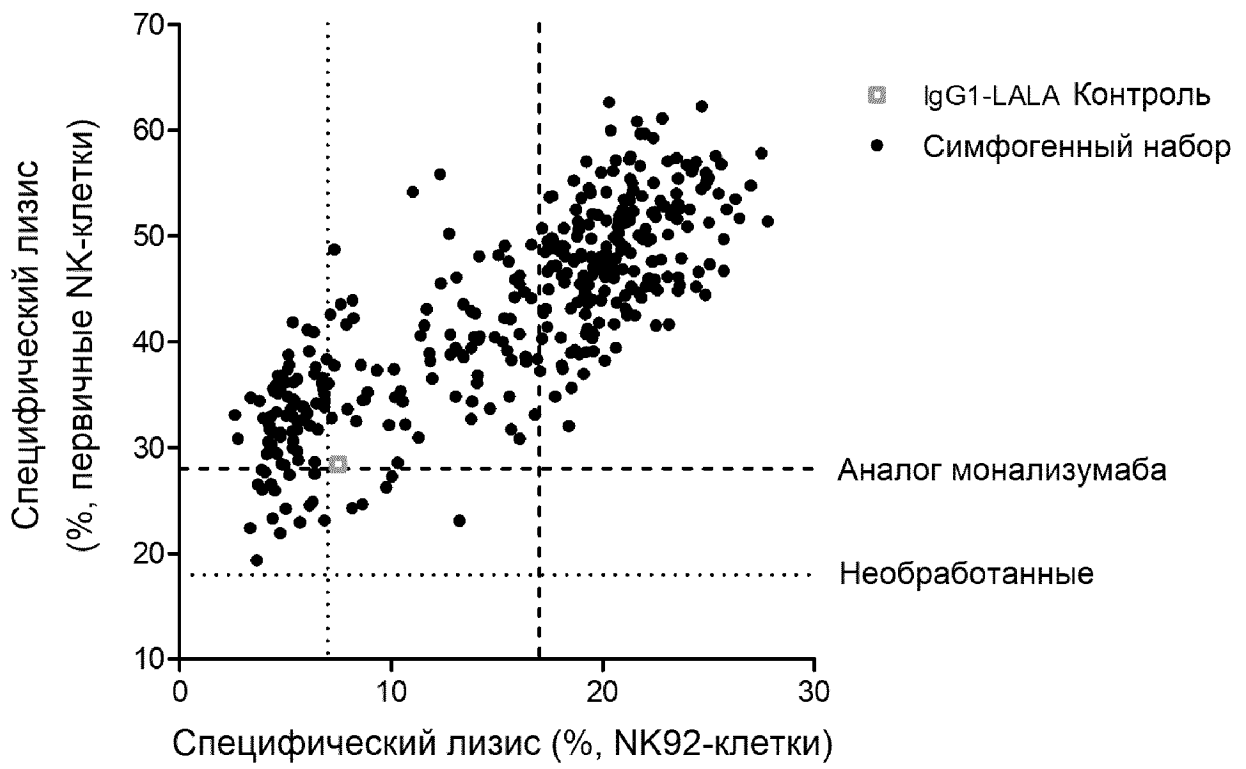


ФИГ. 4 (продолж.)

ФИГ. 5

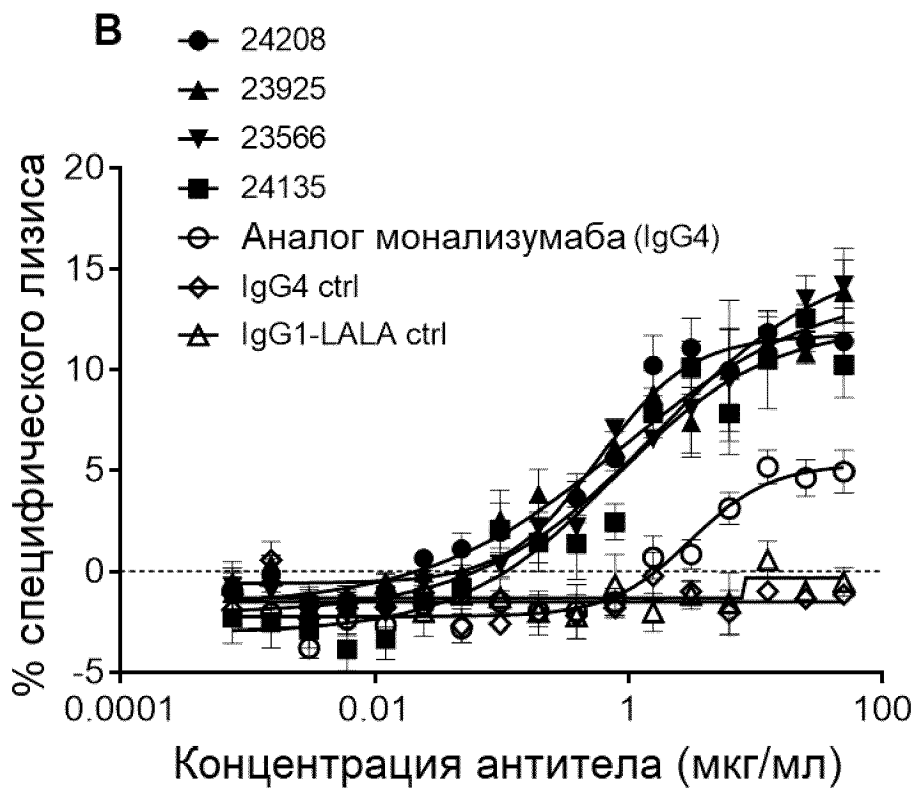
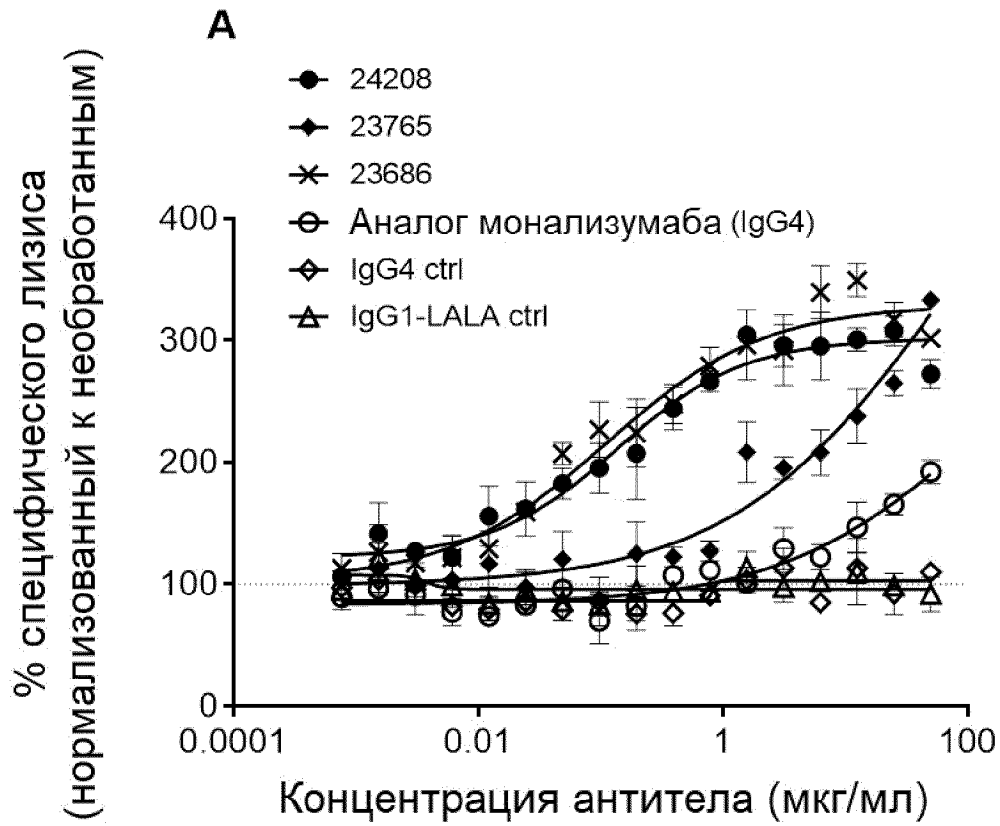


С

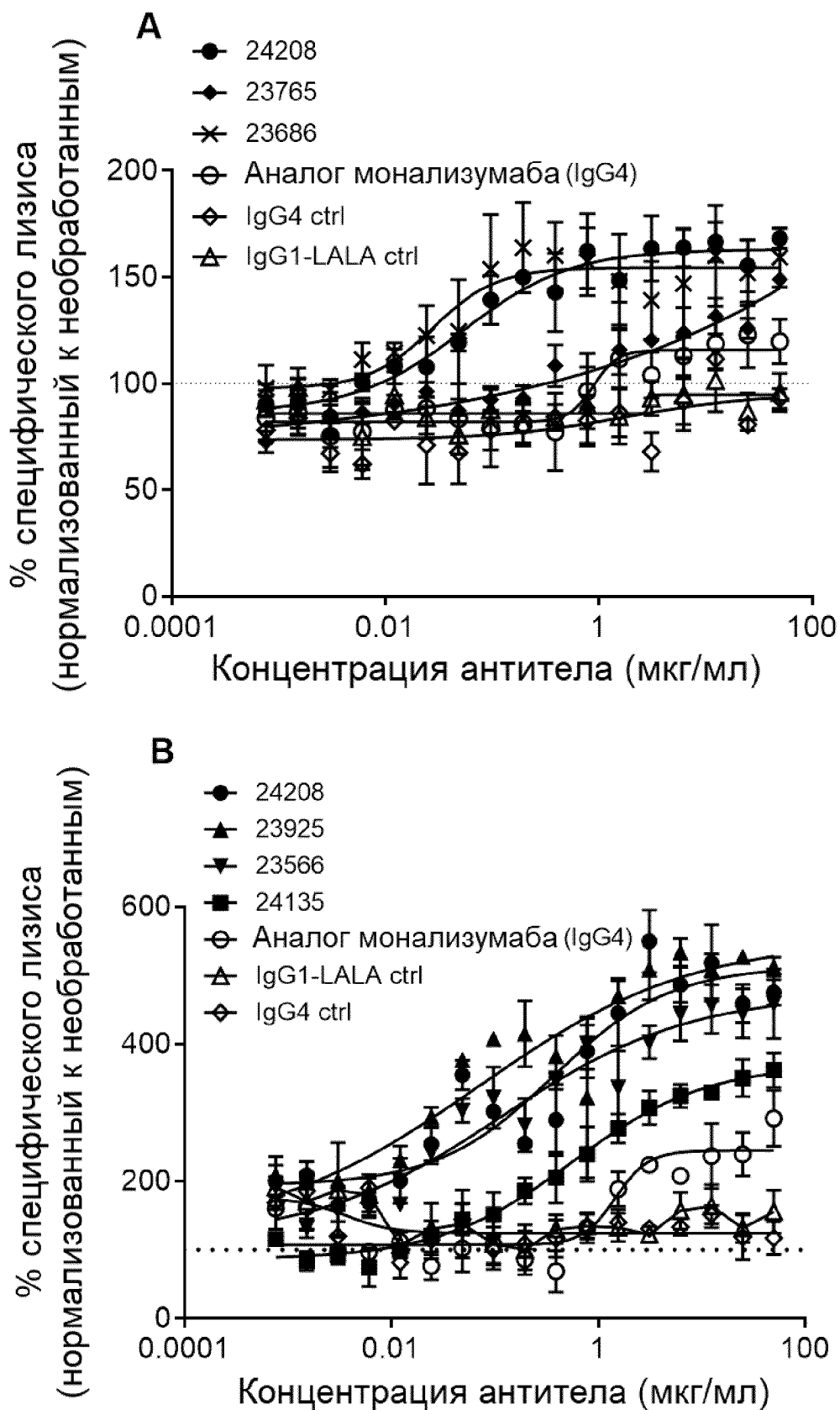


ФИГ. 5 (продолж.)

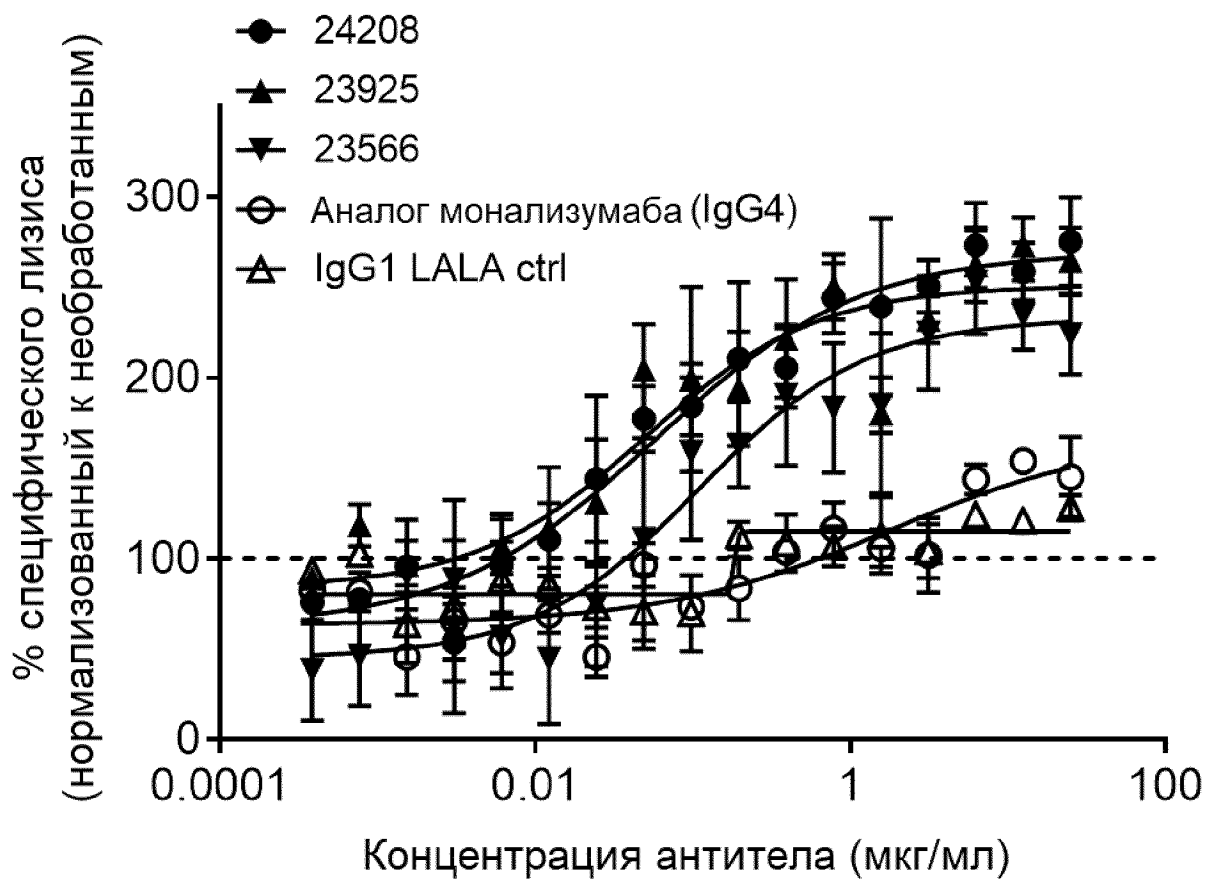




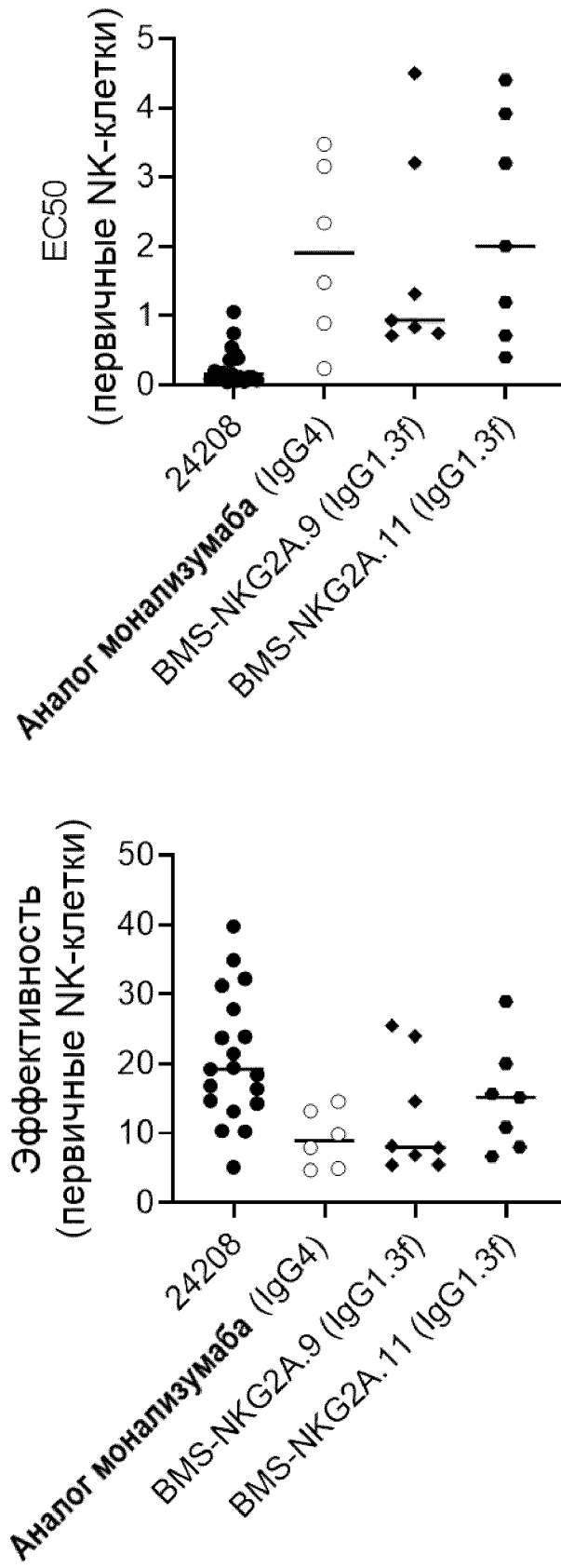
ФИГ. 6



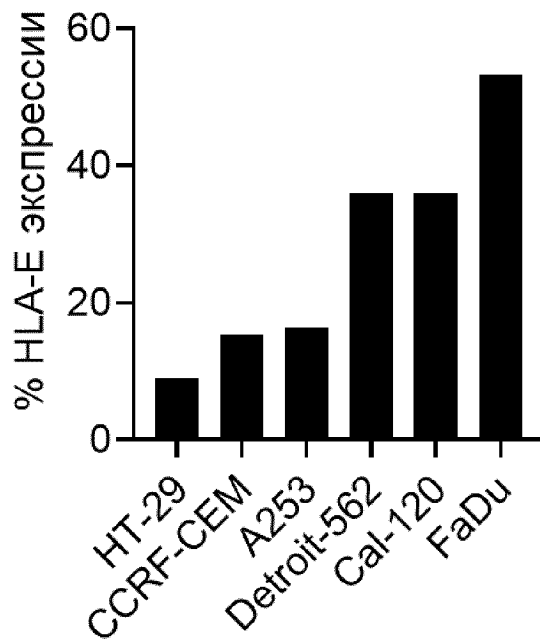
ФИГ. 7



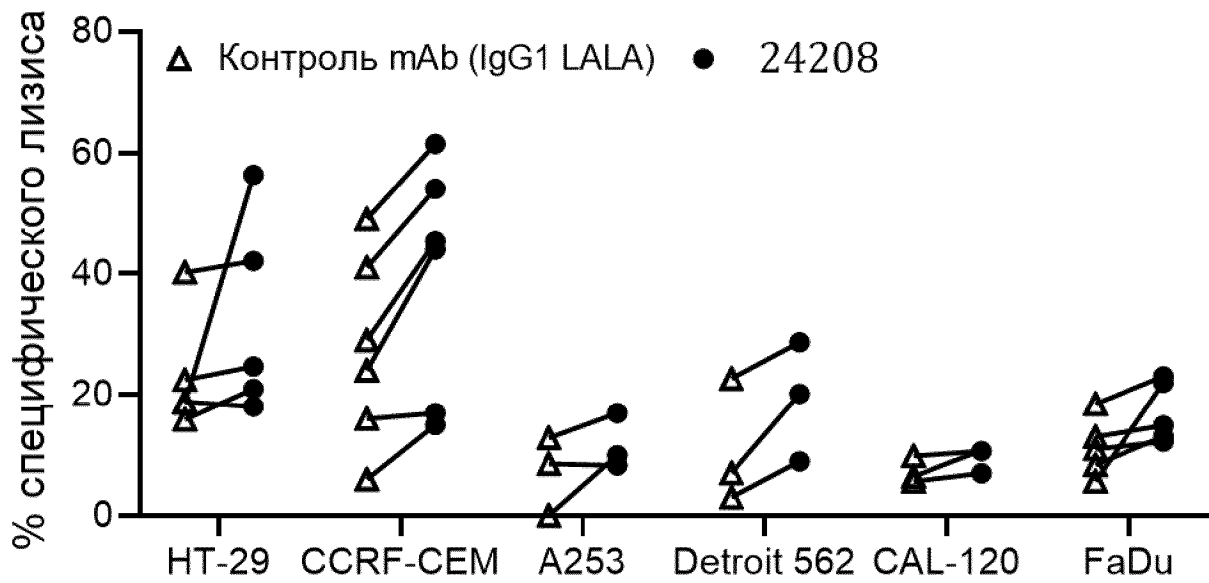
ФИГ. 8



ФИГ.9



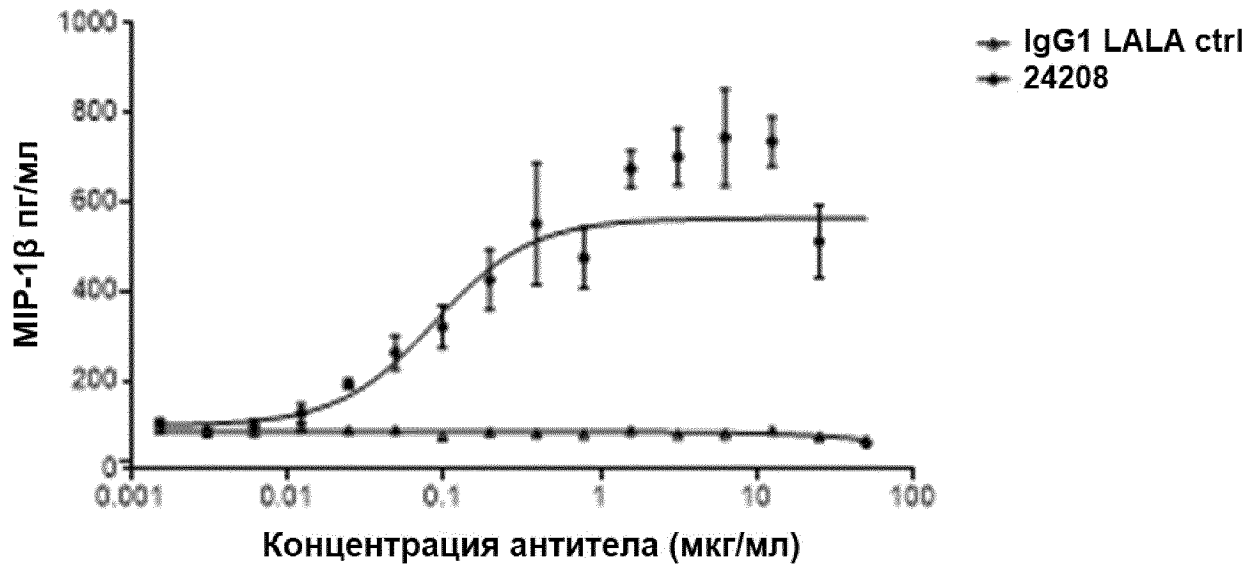
A



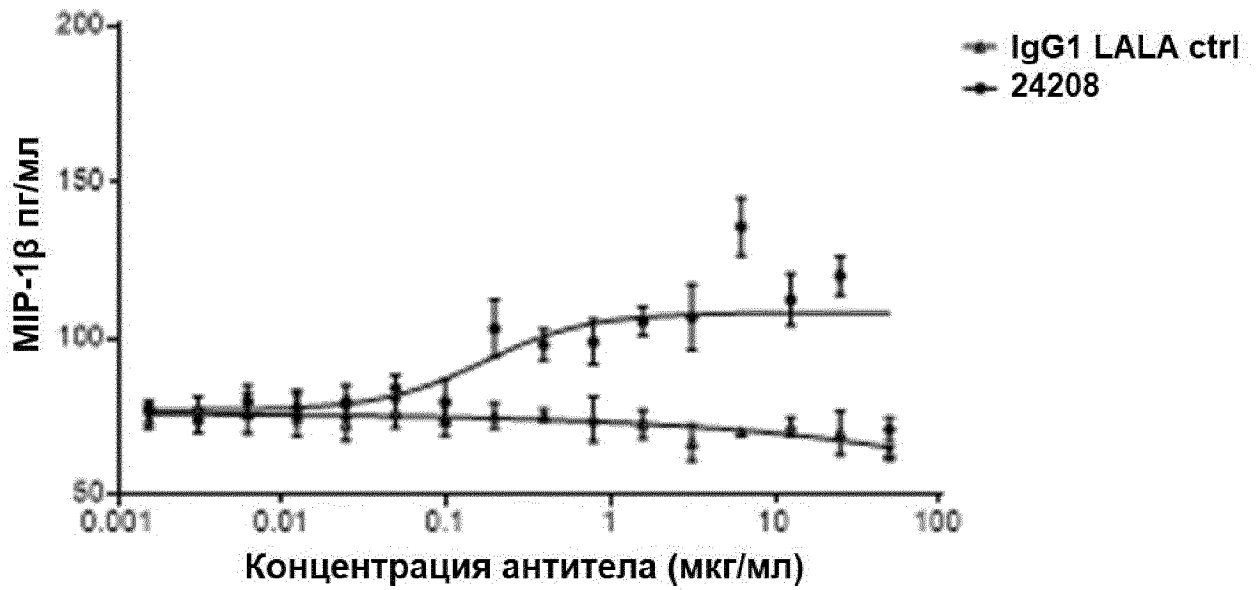
B

ФИГ.10

## Сокультура тримерных клеток HLAЕ А549



## Сокультура тримерных клеток HLAЕ JIMT-1



ФИГ.11