



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2023.02); A61K 2039/505 (2023.02); C07K 2317/33 (2023.02); C07K 2317/90 (2023.02); A61P 35/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2020137068, 17.04.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.04.2019Дата регистрации:  
08.06.2023

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
18.04.2018 EP 18168011.7

(43) Дата публикации заявки: 18.05.2022 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 08.06.2023 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 18.11.2020(86) Заявка РСТ:  
EP 2019/060007 (17.04.2019)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2019/202040 (24.10.2019)Адрес для переписки:  
105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр.  
1, секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ",  
Веселицкий Максим Борисович

(72) Автор(ы):

ДЕНГЛЬ Штефан (DE),  
ФЕНН Зебастиан (DE),  
ФИШЕР Йенс (DE),  
ХИНЦ Андреас (DE),  
КИРСТЕНПФАД Клаудия (DE),  
КЛОСТЕРМАНН Штефан (DE),  
МЁЛЛЕКЕН Йёрг (DE),  
ТИФЕНТАЛЕР Георг (DE),  
ХОВЕС Забине (DE),  
БУЙОТЦЕК Александер (DE),  
МАДЖЕТИ Мехер (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: DANLI WU et al. "Rescuing  
lymphocytes from HLA-G immunosuppressive  
effects mediated by the tumor  
microenvironment", ONCOTARGET, vol. 6, no.  
35, 10.11.2015. WO 2017207775 A1, 07.12.2017.  
RUI WAN et al. "Human Leukocyte Antigen-G  
Inhibits the Anti-Tumor Effect of Natural Killer  
Cells via Immunoglobulin-Like Transcript 2 in  
Gastric Cancer", CELLULAR (см. прод.)

## (54) АНТИ-HLA-G АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Представлены: анти-HLA-G антитело, способ его получения и применения для лечения рака. Также представлены выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, клетка-хозяин, предназначенная для

продуцирования антитела, и фармацевтический состав для лечения рака. Изобретение позволяет получить новые антитела, обладающие высокой аффинностью к HLA-G. 8 н. и 5 з.п. ф-лы, 11 ил., 13 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 44, no. 5, 01.01.2017. RU 2635537 C2, 13.11.2017.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C07K 16/28 (2023.02); A61K 2039/505 (2023.02); C07K 2317/33 (2023.02); C07K 2317/90 (2023.02); A61P 35/00 (2023.02)*

(21)(22) Application: **2020137068, 17.04.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**17.04.2019**

Registration date:  
**08.06.2023**

Priority:

(30) Convention priority:  
**18.04.2018 EP 18168011.7**

(43) Application published: **18.05.2022 Bull. № 14**

(45) Date of publication: **08.06.2023 Bull. № 16**

(85) Commencement of national phase: **18.11.2020**

(86) PCT application:  
**EP 2019/060007 (17.04.2019)**

(87) PCT publication:  
**WO 2019/202040 (24.10.2019)**

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,  
sektiya 1, etazh 3, "EVROMARKPAT", Veselitskij  
Maksim Borisovich**

(72) Inventor(s):

**DENGL Stefan (DE),  
FENN Sebastian (DE),  
FISCHER Jens (DE),  
HINZ Andreas (DE),  
KIRSTENPFAD Claudia (DE),  
KLOSTERMANN Stefan (DE),  
MOELLEKEN Joerg (DE),  
TIEFENTHALER Georg (DE),  
HOVES Sabine (DE),  
BUJOTZEK Alexander (DE),  
MAJETY Meher (DE)**

(73) Proprietor(s):

**F. Hoffmann-La Roche AG (CH)**

(54) **ANTI-HLA-G ANTIBODIES AND THEIR USE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: anti-HLA-G antibody, method for its production and use for cancer treatment are presented. Also an isolated nucleic acid encoding an antibody, a host cell designed to produce the antibody,

and a pharmaceutical composition for the treatment of cancer are provided.

EFFECT: invention makes it possible to obtain new antibodies with high affinity for HLA-G.

13 cl, 11 dwg, 13 tbl, 7 ex

**C 2  
4  
2  
7  
7  
2  
4  
6  
7  
2  
7  
9  
7  
2  
4  
R U**

**R U  
2  
7  
9  
7  
7  
2  
4  
C 2**

Настоящее изобретение относится к анти-HLA-G антителам, их получению, составам и способам их применения.

Предпосылки создания настоящего изобретения

5 Главный комплекс гистосовместимости человека, класса I, б, известный также как лейкоцитарный антиген G человека (HLA-G), представляет собой белок, который у человека кодируется геном HLA-G. Ген HLA-G принадлежит к паралограм тяжелой цепи HLA неклассического класса I. Это соединение класса I является гетеродимером, состоящим из тяжелой цепи и легкой цепи ( $\beta$ -2 микроглобулин). Тяжелая цепь заякорена в мембране, но может также высвобождаться/секретироваться.

10 - Тяжелая цепь состоит из трех доменов:  $\alpha$  1,  $\alpha$  2 и  $\alpha$  3. Домены  $\alpha$  1 и  $\alpha$  2 образуют бороздку для связывания пептида, фланкированную двумя  $\alpha$ -спиралями. Небольшие пептиды (приблизительно 9-членные) могут связываться с этой бороздкой, как и другие белки MHC I.

15 - Вторая цепь является  $\beta$ -2 микроглобулином, который связывается с тяжелой цепью, как и другие белки MHC I.

HLA-G существует в семи изоформах, 3 из которых представляют собой секретлируемые формы, а остальные 4 представляют собой связанные с мембраной формы (как показано на схеме, фиг. 1).

20 HLA-G может формировать олигомерные структуры функционально активного комплекса (Kuroki, K и др., Eur J Immunol. 37 1727-1729 (2007)). Связанные дисульфидной связью димеры образуются за счет дисульфидной связи между остатками Cys 42 двух молекул HLA-G (Shiroishi M и др., J Biol Chem 281 10439-10447 (2006)). Тримерные и тетрамерные комплексы описаны также в статьях Kuroki K и др. Eur J Immunol. 37 1727-1729 (2007), Allan D.S., и др. J Immunol Methods, 268 43-50 (2002) и T Gonen-Gross и др., J  
25 Immunol 171 1343-1351 (2003).

30 HLA-G преимущественно экспрессируется на цитотрофобластах в плаценте. Некоторые опухоли (включая рак поджелудочной железы, молочной железы, кожи, колоректальный рак, рак желудка и яичников) экспрессируют HLA-G (Lin A. и др., Mol Med. 21 782-791 (2015), Amiot L. и др., Cell Mol Life Sci. 68 417-431 (2011)). Описано также, что экспрессия связана с патологическими состояниями, такими как воспалительные заболевания, реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD) и рак. Описано так же, что экспрессия HLA-G связана с неблагоприятным прогнозом при раке. Раковые клетки уклоняются от иммунного надзора хозяина за счет индукции иммунной толерантности/подавления благодаря экспрессии HLA-G.

35

Краткая характеристика полиморфизма семейства HLA		
HLA-A	2579 последовательностей	Классический класс I MHC
HLA-B	3283 последовательности	
HLA-C	2133 последовательности	
HLA-E	15 последовательностей	Неклассический класс I MHC
HLA-F	22 последовательности	
HLA-G	50 последовательностей	

45

HLA-G характеризуется высокой гомологией (>98%) с другими молекулами MHC I, поэтому возникают проблемы с получением действительно HLA-G специфических антител без перекрестной реактивности с другими молекулами MHC I.

Ранее были описаны определенные антитела, которые различным образом

взаимодействуют с HLA-G: антитела, описанные в статье *Tissue Antigens*, 55 (2000) 510-518, относятся к моноклональным антителам, например, 87G и MEM-G/9; антитела, описанные в статье *Neoplasma* 50 (2003) 331-338, относятся к определенным моноклональным антителам, распознающим как олигомерный комплекс

5 полноразмерного HLA-G (например, 87G и MEM-G9), так и HLA-G, не-содержащий тяжелую цепь (например, 4H84, MEM-G/1 и MEM-G/2); антитела, описанные в статье *Hum Immunol.* 64 (2003) 315-326, относятся к некоторым антителам, тестированным на опухолевых клетках JEG3, которые экспрессируют HLA-G (например, MEM-G/09 и -G/13, которые взаимодействуют исключительно с природными молекулами HLA-G1.

10 MEM-G/01 распознают (аналогично антителам 4H84 mAb) денатурированную тяжелую цепь HLA-G всех изоформ, в то время как MEM-G/04 селективно распознают денатурированные изоформы HLA-G1, -G2 h-G5; антитела, описанные в статье *Wiendl и др. Brain* 2003 176-85, относятся к различным моноклональным антителам HLA-G, например, 87G, 4H84, MEM-G/9.

15 В указанных выше публикациях сообщается об антителах, которые связываются с HLA-G человека или с комплексом HLA-G/ $\beta$ 2M МНС человека. Однако в связи с высоким полиморфизмом и высокой гомологией семейства HLA, большинство антител не обладают действительно специфичными свойствами связывания с HLA-G, и в большинстве случаев связываются также с другими членами семейства HLA или

20 проявляют перекрестную реактивность к ним (либо в виде комплекса МСН с формой, содержащей  $\beta$ 2M, или с формой, не содержащей  $\beta$ 2M) или они просто не ингибируют связывание комплекса HLA-G  $\beta$ 2M МНС с его рецепторами ILT2 и/или ILT4 (и рассматриваются как неантагонистические антитела).

Следовательно, существует необходимость создать и/или выбрать дополнительно

25 улучшенные, действительно специфические к HLA-G антитела, которые проявляют ингибирующие свойства в отношении рецепторов.

Краткое описание настоящего изобретения

В объекте настоящего изобретения предлагается антитело, которое связывается с HLA-G (и которое ингибирует связывание ILT2 с HLAG на клетках JEG-3 (ATCC HTB36)

30 и восстанавливает HLA-G специфичное сниженное высвобождение TNF- $\alpha$  моноцитами, совместно культивируемыми с клетками JEG-3.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделяют антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43),

35 где антитело включает

А) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 3, и (b) домен VL,

40 включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или

В) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную

45 последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 11, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13

и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или  
 C) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 19, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или  
 D) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 27, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения выделяют антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M MHC I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

- 20 A)  
 (i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 8,  
 (ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i), или  
 B)  
 25 (i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16,  
 (ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i), или  
 C)  
 (i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ  
 30 ID NO: 24,  
 (ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i), или  
 D)  
 (i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32,  
 35 (ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения описанное в данном контексте анти-HLA-G антитело

- a) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M MHC I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или  
 40 в) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M MHC I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 39 и последовательность SEQ ID NO: 37, и/или  
 c) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M MHC I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или  
 45 d) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M MHC I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или  
 e) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M MHC I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или

f) ингибирует связывание ИЛТ2 с тримерным комплексом HLA-G β2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

g) ингибирует связывание ИЛТ2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G β2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

h) ингибирует связывание (с HLA-G) с клетками JEG3 (ATCC No. HTB36), и/или

i) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (см. пример 5), и ингибирует связывание ИЛТ2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

j) ингибирует связывание CD8a с HLAG более чем на 80% (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4c).

В одном варианте анти-HLA-G антитело представляет собой изотип IgG1.

В другом варианте антитело представляет собой изотип IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU индексу Кабата).

В еще одном варианте анти-HLA-G антитело ингибирует связывание ИЛТ2 с мономерным комплексом HLA-G β2M МНС I.

В одном варианте анти-HLA-G антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело.

В другом варианте анти-HLA-G антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное или гибридное антитело человека.

В еще одном варианте анти-HLA-G антитело по настоящему изобретению, которое является фрагментом антитела, который связывается с HLA-G.

В одном варианте анти-HLA-G антитело по настоящему изобретению представляет собой Fab фрагмент.

В изобретении предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих пунктов.

В изобретении предлагается клетка хозяина, включающая указанную нуклеиновую кислоту.

В изобретении предлагается способ продуцирования антител, включающий культивирование клетки хозяина таким образом, чтобы клетки продуцировали антитело.

В изобретении предлагается указанный способ получения антитела, дополнительно включающий выделение антитела из клетки хозяина.

В изобретении предлагается фармацевтический состав, включающий антитело, описанное в данном контексте, и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении предлагается антитело, описанное в данном контексте, для применения в качестве лекарственного средства.

В изобретении предлагается антитело, описанное в данном контексте, для применения при лечении рака.

В изобретении предлагается применение антитела, описанного в данном контексте, при получении лекарственного средства. В одном варианте лекарственное средство предназначено для лечения рака.

В изобретении предлагается способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму эффективного количества антитела, описанного в данном контексте.

В настоящем изобретении используют специально разработанные гибридные

антигены и/или строгие скрининговые анализы для идентификации HLA-G-специфических антител среди множества кандидатов (исключая перекрестную реактивность к другим соединениям комплекса MHC класса I и в то же время выбирая антитела, блокирующие рецептор HLA-G (такой как ILT2), которые проявляют HLA-G-специфичную индукцию (восстановление) TNF- $\alpha$  в совместно культивируемых культурах экспрессирующих HLA-G клетках JEG-3 и моноцитах. В результате использования таких скрининговых методов, описанных в данном контексте, были выбраны новые анти-HLA-G антитела. Эти антитела проявляют высоко варьируемые свойства, такие как значительное ингибирование связывания ILT2 с HLA-G, который экспрессируется на клетках JEG-3, или ингибирование связывания ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом ILT2 В $\beta$ M MHC I.

В изобретении предлагаются антитела, которые специфически связываются с HLA-G человека, ингибируют связывание ILT2 с HLAG, и восстанавливают HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ, восстанавливают индуцированные липополисахаридом (LPS) продуцирование/секрецию TNF- $\alpha$  моноцитами в совместно культивируемых культурах экспрессирующих HLA-G клеток (например, клетки JEG-3). Восстановление действительно HLA-G-специфичного подавления иммунного ответа моноцитов HLA-G-экспрессирующими клетками, такими как клетки JEG-3, можно оценивать по сравнению с HLA-G нокаутными клетками JEG-3.

Таким образом, антитела по изобретению восстанавливают HLA-G-специфичное высвобождение TNF- $\alpha$  в стимулированных липополисахаридом (LPS) совместно культивируемых культурах, экспрессирующих HLA-G клетках JEG-3 и моноцитах по сравнению с необработанными совместно культивируемыми клетками JEG-3 (в качестве отрицательного контроля использовали необработанные клетки, 0%, в качестве положительного контроля использовали культуры только моноцитов, 100%, в которых высвобождение TNF-альфа не подавляется любыми HLA-G/IL-T2-специфичными эффектами (см. пример 7).

Кроме того антитела являются высоко специфичными и не проявляют перекрестную реактивность в отношении комплексов HLA-A MHC I или MHC I мыши или крысы.

Описание фигур

На фигуре 1 представлены различные изоформы HLA-G.

На фигуре 2А представлено схематическое изображение структуры HLA-G, связанного с  $\beta$ 2M.

На фигуре 2Б представлена структура молекулы HLA-G, связанного с определенными рецепторами: структура HLA-G в комплексе с данными рецепторами, такими как ILT4 и KIR2DL1. Структура ILT4 (код PDB: 2DYP). Структура KIR2DL1 соответствует коду PDB 1IM9 (структура комплекса KIR2DL1: HLA-Cw4) и расположена на структуре HLA-G при наложении структур HLA-Cw4 и HLA-G. Рецепторы показаны с использованием ленточного представления, HLA-G показан с использованием представления молекулярной поверхности. Остатки HLA-G, которые являются уникальными или консервативными в других паралогах HLA, окрашены белым и серым цветом, соответственно. Уникальные поверхностные остатки замещены на консенсусную последовательность HLA в гибридном контрантигене.

На фигуре 3 представлены антитела HLA-G, которые ингибируют (или стимулируют) взаимодействие/связывание HLA-G с ILT2 и ILT4, а также с CD8:

Фиг. 3А: ингибирование ILT2

Фиг. 3Б: ингибирование ILT4

Фиг. 3В: ингибирование CD8.

На фигуре 4 представлен анализ проточной цитометрией экспрессии HLA-G на поверхности клетки с использованием антител HLA-G на клетках JEG-3 (клетки, природно экспрессирующие HLA-G), клетках SKOV-3 (клетки дикого типа (wt) по сравнению с HLA-G-трансфектированными клетками (HLAG+)), и клетки PA-TU-8902 (дикого типа (wt) по сравнению с HLA-G-трансфектированными клетками (HLAG+));

5     фиг. 4А: HLA-G-0031 (#0031), фиг. 4Б: HLA-G-0039 (#0039),  
       фиг. 4В: HLA-G-0041 (#0041), фиг. 4Г: HLA-G-0090 (#0090).

Фиг. 5

Фиг. 5А: анти-HLA-G антитела (0031, 0039, 0041 и 0090) блокируют/модулируют взаимодействие гибридного ИЛТ2 Fc с HLA-G, экспрессируемым на клетках JEG3:

Окрашивание HLA-G на клеточной поверхности новыми анти-HLA-G антителами оценивали с использованием антикрысиных вторичных антител IgG, конъюгированных с Alexa488 (верхний ряд). На гистограммах FACS показаны клетки, окрашенные только вторичным антителом (серые пунктирные линии), и клетки, окрашенные анти-HLA-G антителами (черные сплошные линии). В нижнем ряду изображен ИЛТ2-Fc человека, связанный с HLA-G на клетках JEG3 (черная пунктирная линия) по сравнению с клетками, окрашенными только вторичными антителами (серая пунктирная линия). Можно увидеть влияние предварительной инкубации клеток JEG3 с на связывание с гибридным ИЛТ2-Fc (черная сплошная линия): HLA-G-0031 и HLA-G-0090

20     характеризуются почти полным ингибированием связывания гибридного ИЛТ2-Fc с клетками JEG3. Интересно отметить, что два антитела 0039 и 0041 даже повышают связывание ИЛТ2:fc с клетками.

Фиг. 5Б: Влияние коммерческих/стандартных анти-HLA-G антител на связывание гибридного ИЛТ2-Fc с HLA-G на клетках JEG3:

25     Окрашивание HLA-G на клеточной поверхности коммерческими/стандартными анти-HLA-G антителами оценивали с использованием видоспецифичных вторичных антител, конъюгированных с Alexa488 (верхний ряд). На гистограммах FACS показаны клетки, окрашенные только вторичным антителом (серые пунктирные линии), и клетки, окрашенные анти-HLA-G антителами (черные сплошные линии). В нижнем ряду

30     изображен гибридный ИЛТ2-Fc человека, связанный с HLA-G на клетках JEG3 (черная пунктирная линия) по сравнению с клетками, окрашенными только вторичным антителом (серая пунктирная линия). Можно увидеть влияние предварительной инкубации клеток JEG3 со стандартными антителами на связывание с гибридным ИЛТ2-Fc (черная сплошная линия). Ни одно из исследованных стандартных антител не

35     блокировало взаимодействие гибридного ИЛТ2-Fc с HLA-G на клеточной поверхности JEG3.

Фиг. 6

Влияние блокировки HLA-G ингибирующими анти-HLA-G антителами на восстановление продуцирования TNF $\alpha$ , которое оценивали на различных донорах.

40     Фиг. 6А: анти-HLA-G антитела, HLA-G-0031 (#0031), HLA-G-0039 (#0039), и HLA-G-0041 (#0041), оценивали на репрезентативном доноре моноцитов.

Фиг. 6Б: анти-HLA-G антитела, HLA-G-0090 (#0090)], оценивали на различных донорах моноцитов.

45     Фиг. 6В: Анализ экспрессии HLAG в клетках JEG3 дикого типа и нокдаун-вариантов с использованием метода вестерн-блота.

Подробное описание настоящего изобретения

Использованные в данном контексте термины "HLA-G", "HLA-G человека" относятся к главному комплексу гистосовместимости человека, класса I, G, известному также как

лейкоцитарный антиген G (HLA-G) (например, последовательность SEQ ID NO: 35). Обычно HLA-G образует комплекс МНС класса I совместно с  $\beta 2$  микроглобулином ( $\beta 2M$  или  $\beta 2m$ ). В одном варианте осуществления HLA-G относится к комплексу МНС класса I HLA-G и  $\beta 2$  микроглобулина.

5       Использованные в данном контексте термины антитело, "связывающееся с HLA-G человека", "специфически связывающееся с HLA-G человека", «которое связывается с HLA-G человека» или «анти-HLA-G антитело» относятся к антителу, специфически связывающемуся с антигеном HLA-G человека или его внеклеточным доменом (ECD),  
10       причем связывающая аффинность, то есть значение  $K_D$  составляет  $5,0 \times 10^{-8}$  моль/л или менее, в одном варианте значение  $K_D$  составляет  $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л или менее, в другом варианте значение  $K_D$  составляет от  $5,0 \times 10^{-8}$  моль/л до  $1,0 \times 10^{-13}$  моль/л. В еще одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta 2M$  МНС I, включающим  
15       последовательность SEQ ID NO: 43).

Связывающую аффинность определяют стандартным методом анализа связывания, таким как поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Швеция), например, с использованием конструкторов, включающих внеклеточный домен HLA-G (например, в составе его природной тримерной структуры). В одном варианте связывающую аффинность определяют стандартным методом анализа связывания с  
20       использованием типичного растворимого комплекса HLA-G, включающего комплекс МНС класса I, включающий последовательность SEQ ID NO: 43.

HLA-G характеризуется повторяющимся изгибом МНС I и состоит из двух цепей: цепь 1 состоит из трех доменов:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ . Домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  образуют бороздку для  
25       связывания пептида, фланкированную двумя  $\alpha$ -спиралями. Небольшие пептиды (приблизительно 9-членные) могут связываться с этой бороздкой, как и другие белки МНС I. Цепь 2 является  $\beta$ -2 микроглобулином, сходным с другими белками МНС I.

HLA-G может формировать олигомерные структуры функционально активного комплекса (Kuroki, K и др., Eur J Immunol. 37, 1727-1729 (2007)). Связанные дисульфидной  
30       связью димеры образуются за счет дисульфидной связи между остатками Cys 42 двух молекул HLA-G (Shiroishi M и др., J Biol Chem 281, 10439-10447 (2006)). Тримерные и тетрамерные комплексы описаны также в статьях Kuroki K и др. Eur J Immunol. 37 1727-1729 (2007), Allan D.S. и др. J Immunol Methods, 268, 43-50 (2002) и T Gonen-Gross и др., J Immunol 171 1343-1351 (2003). В статье Boyson и др., Proc Nat Acad Sci USA, 99: 16180  
35       (2002) указано, что рекомбинантная растворимая форма HLA-G5 может образовывать связанный дисульфидной связью димер, а именно содержащий межмолекулярную дисульфидную связь Cys42-Cys42. Кроме того, связанная с мембраной форма HLA-G1 также может образовывать связанный дисульфидной связью димер на клеточной  
40       поверхности линии клеток Jeg3, которые эндогенно экспрессируют HLA-G. Связанные дисульфидной связью формы HLA-G1 и HLA-G5 можно также обнаружить на клеточной поверхности трофобластов (Apps, R., Tissue Antigens, 68:359 (2006)).

HLA-G преимущественно экспрессируется на цитотрофобластах в плаценте. Некоторые опухоли (включая рак поджелудочной железы, молочной железы, кожи, колоректальный рак, рак желудка и яичников) экспрессируют HLA-G (Lin A. и др., Mol  
45       Med. 21, 782-791 (2015), Amiot L. и др., Cell Mol Life Sci. 68, 417-431 (2011)). Описано также, что экспрессия связана с патологическими состояниями, такими как воспалительные заболевания, реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD) и рак. Описано так же, что экспрессия HLA-G связана с неблагоприятным прогнозом при раке. Раковые клетки уклоняются от иммунного надзора хозяина за счет индукции

толерантности/подавления иммунного ответа благодаря экспрессии HLA-G.

5 HLA-G существует в семи изоформах, 3 из которых представляют собой секретируемые формы, а остальные 4 представляют собой связанные с мембраной формы (как показано на схеме, фиг. 1). Наиболее функциональные изоформы HLA-G включают HLA-G1 и HLA-G5, ассоциированные с  $\beta$ -2 микроглобулином. Однако 5 толерогенный иммунный эффект (вызывающий иммунную толерантность) этих изоформ различается и зависит от формы лиганда (мономер, димер) и от аффинности взаимодействия лигандов с рецептором.

10 Белок HLA-G можно получить с использованием стандартных технологий молекулярной биологии. Нуклеотидная последовательность изоформ HLA-G известна в данной области техники. См., например, GENBANK Accession No. AY359818.

Изомерные формы HLA-G ускоряют передачу сигнала через рецепторы ИЛТ, прежде всего ИЛТ2, ИЛТ4 или их комбинации.

15 Рецепторы ИЛТ: ИЛТ представляют собой активирующие и ингибирующие рецепторы типа Ig, которые принимают участие в регуляции активации иммунных клеток и контроле функции иммунных клеток (Borges L., и др., Curr Top Microbial Immunol, 244:123-136 (1999)). ИЛТ разделяют на три группы категорий: (i) ингибирующие, то есть содержащие ингибирующий мотив на основе тирозина (ТИМ) цитоплазматического иммунорецептора, и трансдуцирующий ингибирующий сигнал (ИЛТ2, ИЛТ3, ИЛТ4, ИЛТ5 и LIR8); (ii) 20 активирующие, то есть содержащие короткий цитоплазматический хвост и заряженный аминокислотный остаток в трансмембранном домене (ИЛТ1, ИЛТ7, ИЛТ8 и LIR6 $\alpha$ ), и доставляющий активирующий сигнал через активирующий мотив на основе тирозина (ТАМ) цитоплазматического иммунорецептора в составе ассоциированной общей  $\gamma$ -цепи Fc рецептора, и (iii) растворимое соединение ИЛТ6 с отсутствующим 25 трансмембранным доменом. В результате ряда недавних исследований была выявлена иммунорегуляторная роль ИЛТ на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). Рецепторы ИЛТ2, ИЛТ3 и ИЛТ4, наиболее характерные рецепторы ингибирования иммунного ответа, экспрессируются преимущественно на миелоидных и плазмоцитойдных DC (дендритных клетках). Уровень экспрессии ИЛТ3 и ИЛТ4 повышается при воздействии на незрелые DC известных иммунодепрессивных факторов, включая ИЛ-10, витамин D3, или супрессивные CD8 Т клетки (Chang C.C. и др., Nat Immunol, 3: 30 237-243 (2002)). Экспрессия ИЛТ на DC строго контролируется воспалительными стимулами, цитокинами и факторами роста, а также регулируется с понижением активности после активации DC (Ju X.S., и др., Gene, 331:159-164 (2004)). Экспрессия 35 рецепторов ИЛТ2 и ИЛТ4 в значительной степени регулируется активацией гистонов, что вносит вклад в строго контролируемую экспрессию генов исключительно в клетках миелоидной линии (Nakajima H., J Immunol, 171:6611-6620 (2003)).

Занятость ингибирующих рецепторов ИЛТ2 и ИЛТ4 изменяет профиль секреции/ высвобождения цитокинов и хемокинов из моноцитов и может ингибировать передачу 40 сигнала рецептором Fc (Colonna M., и др. J Leukoc Biol, 66:375-381 (1999)). Роль и функция ИЛТ3 на клетках DC подробно описана группой авторов (Suci-Foca N., Int Immunopharmacol, 5:7-11 (2005)). Хотя лиганд для ИЛТ3 не известен, в отношении ИЛТ4 известно, что он связывается с третьим доменом молекул HLA класса I (HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-G), конкурируя с CD8 для связывания МНС класса I (Shiroishi M., Proc Natl Acad Sci USA, 100:8856-8861 (2003)). Предпочтительным лигандом для нескольких 45 ингибирующих рецепторов ИЛТ является HLA-G. HLA-G играет потенциальную роль в переносимости системы мать-плод и в механизмах уклонения опухолевых клеток от распознавания и разрушения в ходе иммунного ответа (Hunt J.S. и др., Faseb J, 19:681-

693 (2005)). Наиболее вероятно, что регуляция функции DC за счет взаимодействий HLA-G- ИЛТ является важным путем в биологии DC. Было установлено, что DC, полученные из моноцитов человека, которые в значительной степени экспрессируют рецепторы ИЛТ2 и ИЛТ, при обработке комплексом HLA-G и стимуляции аллогенными Т клетками, все еще восстанавливают устойчивый толерогенно-подобный фенотип (CD80low, CD86low, HLA-DRlow) со способностью индуцировать толерантность Т клеток (Ristich V. и др., Eur J Immunol, 35:1133-1142 (2005)). Более того, взаимодействие HLA-G с DC, которые в значительной степени экспрессируют рецепторы ИЛТ2 и ИЛТ4, приводит к регуляции с понижением активности некоторых генов, включенных в путь презентации комплекса МНС класса II. Активность лизосомальной тиолредуктазы,  $\gamma$ -IFN-индуцируемой лизосомальной тиолредуктазы (GILT), обильно экспрессируемой профессиональными APC, в значительной степени снижается в HLA-G-модифицированных DC. На репертуар первичных CD4+ Т клеток может влиять экспрессия GILT клетками DC, так как ответ Т клеток *in vivo* для выбора антигенов снижается у животных, у которых отсутствует GILT после разрушения генов-мишеней (Marie M. и др., Science, 294:1361-1365 (2001)). Взаимодействие HLA-G/ИЛТ на DC нарушает сборку на клеточной поверхности и транспорт комплексов МНС класса II к клеточной поверхности, что может привести к менее эффективной презентации или экспрессии структурно аномальных комплексов МНС класса II. Было установлено, что HLA-G заметно снижает транскрипцию инвариантной цепи (CD74), генов HLA-DMA, и HLA-DMB на полученных из моноцитов человека DC, в значительной степени экспрессирующих ингибирующие рецепторы ИЛТ (Ristich V. и др., Eur J Immunol 35:1133-1142 (2005)).

Другим рецептором HLA-G является KIR2DL4, так как KIR2DL4 связывается с клетками, экспрессирующими HLA-G (US2003232051; Cantoni C. и др., Eur J Immunol 28 (1998) 1980; Rajagopalan S. и E. O. Long, [список опечаток опубликован в журнале J Exp Med 191 2027 (2000), J Exp Med 189 1093 (1999); Ponte M. и др. PNAS USA 96 5674 (1999)]. KIR2DL4 (так же называемый 2DL4) является членом семейства KIR (также обозначаемый CD158d), причем этот рецептор характеризуется сходством структурных признаков как с активирующими, так и с ингибирующими рецепторами (Selvakumar A. и др. Tissue Antigens 48 285 (1996)). 2DL4 содержит цитоплазматический ИТМ, что свидетельствует об ингибирующей функции, и положительно заряженную аминокислоту в трансмембранной области, то есть признак, типичный для активации KIR. В отличие от других клонально распределенных KIR, 2DL4 транскрибируется всеми клетками NK (Valiante N.M. и др., Immunity 7 739 (1997); Cantoni C. и др., Eur J Immunol 28 1980 (1998), Rajagopalan S. и E.O. Long, [список опечаток опубликован в журнале J Exp Med 191 2027 (2000)] J Exp Med 189 1093 (1999)).

Было также установлено, что HLA-G взаимодействует с CD8 (Sanders и др., J. Exp. Med., 1991) на цитотоксичных Т клетках и индуцирует CD95-опосредованный апоптоз в активированных CD8, положительных цитотоксических Т клетках (Fournel и др., J. Immun., 2000). Об этом механизме удаления цитотоксических Т клеток сообщалось как об одном из механизмов уклонения от иммунного ответа и индукции толерантности при беременности, воспалительных заболеваниях и раке (Amodio G. и др., Tissue Antigens, 2014).

Использованный в данном контексте термин анти-HLA-G антитело, которое «не проявляет перекрестную реактивность с» или «специфически не связывается с» модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2М МНС I человека, включающим SEQ ID NO: 44; комплексом H2Kd  $\beta$ 2М МНС I мыши, включающим SEQ ID NO: 45, комплексом

RT1A  $\beta$ 2M MHC I крысы, включающим SEQ ID NO: 47, комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M MHC I человека, включающим SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 37, означает, что анти-HLA-G антитело в основном не связывается с любым из этих ков. В одном варианте термин анти-HLA-G антитело, которое «не проявляет перекрестную реактивность с» или  
 5 «специфически не связывается с» модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M MHC I человека, включающим SEQ ID NO: 44; комплексом H2Kd  $\beta$ 2M MHC I мыши, включающим SEQ ID NO: 45, комплексом RT1A  $\beta$ 2M MHC I крысы, включающим SEQ ID NO: 47, и/или комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M MHC I человека, включающим SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 37, относится к анти-HLA-G антителу, которое характеризуется только  
 10 неспецифическим связыванием, то есть связывающая аффинность, значение  $K_D$

составляет  $5,0 \times 10^{-6}$  моль/л или более (до отсутствия детектирования связывающей активности). Связывающую аффинность определяют стандартным методом анализа связывания, таким как метод поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Швеция), с использованием соответствующего антигена:  
 15 модифицированный комплекс HLA-G  $\beta$ 2M MHC I человека, включающий SEQ ID NO: 44; комплекс H2Kd  $\beta$ 2M MHC I мыши, включающий SEQ ID NO: 45, комплекс RT1A  $\beta$ 2M MHC I крысы, включающий SEQ ID NO: 47, и/или комплекс HLA-A2  $\beta$ 2M MHC I человека, включающий SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 37. Постановка анализа, а также конструкция/получение антигенов описаны в разделе Примеры.

20 Термин «ингибирует связывание ILT2 с HLAG на клетках JEG-3 (ATCC HTB36)» относится к ингибированию связывающего взаимодействия рекомбинантного ILT2 в ходе анализа, как описано, например, в примере 6.

Термины «восстановление HLA-G-специфичного пониженного иммунного ответа» или «восстанавливают HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ» относятся  
 25 к восстановлению индуцированного липополисахаридом (LPS) продуцирования TNF- $\alpha$  моноцитами в совместно культивируемых культурах экспрессирующих HLA-G клеток, прежде всего клеток JEG-3. Таким образом, антитела по изобретению восстанавливают HLA-G-специфичное высвобождение TNF- $\alpha$  в стимулированных липополисахаридом (LPS) совместно культивируемых культурах экспрессирующих HLA-G клеток JEG-3  
 30 (ATCC HTB36) и моноцитов, по сравнению с необработанными совместно культивируемыми клетками JEG-3 (в качестве отрицательного контроля использовали необработанные клетки, 0%, в качестве положительного контроля использовали культуры только моноцитов, 100%, в которых высвобождение TNF- $\alpha$  не подавляется  
 35 любыми HLA-G/IL-Т2-специфичными эффектами (см. пример 7). В этом контексте «HLA-G-специфичное подавление иммунного ответа» относится к подавлению иммунного ответа моноцитов за счет экспрессии HLA-G на клетках JEG-3. И наоборот, анти-HLA-G антитела по настоящему изобретению не способны восстанавливать иммунный ответ моноцитов в совместно культивируемых культурах клеток JEG-3 и  
 40 нокаутных в отношении HLA-G. Так как другие коммерческие анти-HLA-G антитела способны индуцировать высвобождение TNF- $\alpha$  моноцитами в совместно культивируемых культурах клеток JEG-3, нокаутных в отношении HLA-G, эти антитела являются неспецифичными в отношении HLA-G-специфичного высвобождения TNF- $\alpha$ .

Использованный в данном контексте термин «акцепторный каркасный участок (иммуноглобулина) человека» означает каркасный участок, включающий  
 45 аминокислотную последовательность каркасной структуры переменного домена легкой цепи (VL) или каркасной структуры переменного домена тяжелой цепи (VH), полученные из каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусного каркасного участка человека, как описано ниже. Акцепторный каркасный участок

человека, «полученный из» каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусного каркасного участка человека, может включать идентичную этим последовательностям аминокислотную последовательность, или может включать измененную аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения число аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее. В других вариантах акцепторный каркасный участок VL человека идентичен последовательности каркасного участка VL человека или консенсусной последовательности акцепторным каркасного участка иммуноглобулина человека.

Предпочтительным каркасным участком VH человека для гуманизированного варианта полученного антитела HLAG-0031 является вариант HUMAN\_IGHV1-3. Предпочтительным акцепторным каркасным участком VL человека для гуманизированного варианта полученного антитела HLAG-0031 являются варианты HUMAN\_IGKV1-17 (V домен, с одной дополнительной обратной мутацией в положении R46F, нумерация по Кабату).

Термин «антитело» в данном контексте используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая, но, не ограничиваясь только ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность.

Термин «фрагмент антитела» означает молекулу, отличающуюся от интактного антитела, включающую часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают, но, не ограничиваясь только ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv), и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «антитело, которое связывается с одним и тем же эпитопом», что и эталонное антитело, означает антитело, которое блокирует связывание эталонного антитела со своим антигеном по данным конкурентного анализа на 50% или более, и наоборот, эталонное антитело блокирует связывание антитела со своим антигеном по данным конкурентного анализа на 50% или более. Типичный конкурентный анализ описан в данном контексте.

Термин «гибридный» означает антитело, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или видов, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или видов.

Термин «класс» антитела означает тип консервативного домена или консервативной области, характерный для тяжелой цепи антитела. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub>. Консервативные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно.

Термин «цитотоксический агент», использованный в данном контексте, означает вещество, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клетки. Цитотоксические агенты включают, но, не ограничиваясь только ими, радиоактивные изотопы (например, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка розового (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С,

хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты), ингибиторы факторов роста, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики, токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, а также различные противоопухолевые или противораковые агенты, описанные ниже.

5 Термин «эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозировках в течение необходимых периодов времени, для достижения требуемого терапевтического или профилактического

10 результата.

Термин "Fc область", использованный в данном контексте, означает C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере часть консервативной области. Термин включает природные последовательности Fc областей и варианты последовательностей Fc областей. В одном варианте Fc область тяжелой

15 цепи IgG человека расположена от Cys226, или от Pro230, до C-концевого остатка тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc области или C-концевой глицин (Gly446) и C-концевой лизин (Lys447) Fc области могут как присутствовать, так и отсутствовать. В одном варианте анти-HLA-G антитело, как описано в данном контексте, представляет собой изотип IgG1 и включает консервативный домен тяжелой цепи SEQ

20 ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54. В одном варианте оно дополнительно включает C-концевой глицин (Gly446). В другом варианте указанное антитело дополнительно включает C-концевой глицин (Gly446) и C-концевой лизин (Lys447). В одном варианте анти-HLA-G антитело, как описано в данном контексте, представляет собой изотип IgG4 и включает консервативный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 55. В другом варианте оно

25 дополнительно включает C-концевой глицин (Gly446). В одном варианте указанное антитело дополнительно включает C-концевой глицин (Gly446) и C-концевой лизин (Lys447). Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc области или консервативной области соответствует нумерации согласно системе нумерации EU, также называемому EU индексу, как описано в статье Kabat E.A. и др., Sequences of

30 Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, NIH Publication 91-3242 (1991).

Термин «каркасный участок» или «FR» означает остатки вариабельного домена, отличающиеся от остатков гипервариабельной области (HVR). Участок FR вариабельного домена в основном состоит из четырех FR доменов: FR1, FR2, FR3 и

35 FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR в основном присутствуют в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело", использованные в настоящем контексте, являются взаимозаменяемыми и означают

40 антитело, структура которого в основном аналогична структуре природного антитела, или содержащее тяжелые цепи, которые содержат Fc область, описанную в данном контексте.

Термины «клетка хозяина», «линия клетки хозяина» и «культура клетки хозяина» используют взаимозаменяемо и они означают клетки, в которые включена экзогенная

45 нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки хозяина включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и их потомство без учета числа пересевов. Потомство может быть не полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновых

кислот, но и может содержать мутации. В объем изобретения включено мутантное потомство, которое проявляет ту же самую функцию или биологическую активность по данным скрининга или селекции для исходной трансформированной клетки.

5 Термин «антитело человека» означает антитело, которое включает аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученную из не относящегося к человеку источника, использующего антитела человека, или последовательностей, кодирующих другие антитела человека. Данное определение антитела человека не включает гуманизированные антитела, содержащие антигенсвязывающие остатки, не относящиеся

10 к человеку.

Термин «консенсусный каркасный участок человека» означает каркасный участок, который представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в селекции каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека. В основном, селекция каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина

15 человека включена в подгруппу последовательностей переменного домена. В основном подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную в статье Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD, NIH Publication 91-3242, V. 1-3 (1991). В одном варианте в случае VL, подгруппой является подгруппа каппа I, как описано в статье Kabat и др., см. выше. В другом

20 варианте в случае VH, подгруппой является подгруппа III, как описано в статье Kabat и др., см. выше.

Термин "гуманизированное антитело" означает гибридное антитело, включающее аминокислотные остатки из HVR областей, не относящиеся к человеку, и аминокислотные остатки из FR областей человека. В определенных вариантах

25 гуманизированное антитело включает в основном по меньшей мере все из одного, и обычно из двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR области (например, CDR области) соответствуют областям антитела, не относящегося к человеку, а также все или практически все FR области соответствуют областям антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть консервативной области, полученной из антитела, не относящегося к человеку. Термин

30 "гуманизированная форма» антитела, например, антитела, не относящегося к человеку, означает антитело, которое подвергалось гуманизации.

Термин "гипервариабельная область" или "HVR," использованный в данном контексте, означает каждую из областей переменного домена антитела, которые

35 характеризуются гипервариабельной последовательностью (определяющие комплементарность области или «CDR») и/или образуют структурно определенные петли ("гипервариабельные петли") и/или содержат антиген-контактирующие остатки («антигенные контакты»). В основном, антитела содержат шесть HVR, три в VH домене (H1, H2, H3) и три в VL домене (L1, L2, L3). Примеры HVR, описанные в данном

40 контексте, включают:

(a) гипервариабельные петли в положениях аминокислотных остатков 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol., 196, сс. 901-917 (1987)),

(b) CDR расположены в следующих положениях аминокислотных остатков 24-34

45 (L1), 50-56 L2, 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>e</sup> изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)),

(c) антигенные контакты расположены в следующих положениях аминокислотных

остатков 27 с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)),

(d) комбинации (a), (b) и/или (c), включающие аминокислотные остатки HVR 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35 (H1), 50-63 (H2) и 95-102 (H3).

5 Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в HVR и других остатков в вариабельном домене (например, остатки FR) соответствует нумерации согласно системе нумерации EU, как описано в статье Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

10 «Иммуноконъюгат» означает антитело, образующее конъюгат с одним или более гетерологичным веществом (веществами), включая, но, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксический агент.

Термины «индивидуум» или «субъект» означают млекопитающее. Млекопитающие включают, но, не ограничиваясь только ими, домашних животных (например, крупный 15 рогатый скот, овцы, собаки, кошки и лошади), приматов (например, человек и приматы, не относящиеся к человеку, такие как нечеловекообразные обезьяны), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Прежде всего, индивидуумом или субъектом является человек.

Термин «выделенное» антитело означает антитело, отделенное от компонента его 20 природной окружающей среды. В некоторых вариантах степень очистки антитела составляет более 95% или 99% по данным анализа электрофорезом (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусирование (IEF), капиллярный электрофорез), или хроматографии (например, ионообменная или обращенно-фазная HPLC). Подробное описание методов определения степени очистки см., например, в статье Flatman S. и др., 25 *J. Chromatogr. B* 848 79-87 (2007).

Термин «выделенная» нуклеиновая кислота» означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая была отделена от ее компонента из своей природной окружающей среды. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, 30 содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или расположена в хромосоме, но в положении, которое отличается от природного расположения в хромосоме.

«Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-HLA-G антитело» означает одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелую и легкую цепи 35 антитела (или их фрагменты), включая такие молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты в едином векторе или в отдельных векторах, и такие молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты присутствуют в одном или более участках в клетке хозяина.

Термин «моноклональное антитело», использованный в данном контексте, означает антитело, полученное из популяции в основном гомогенных антител, то есть 40 индивидуальных антител, включающих популяцию, которая идентична и/или связывается с одним и тем же эпитопом, за исключением возможного варианта антител, например, содержащих природные мутации или сформировавшиеся в ходе продуцирования препарата моноклонального антитела, причем такие варианты в основном присутствуют в незначительных количествах. И наоборот, препараты поликлональных антител, 45 которые обычно включают различные антитела, направленные на различные детерминанты (эпитопы), и каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено на единую детерминанту на антигене. Таким образом определение «моноклональное» указывает на характеристику антитела, которое

получено из в основном гомогенной популяции антител, и при этом не требуется конструировать препарат, как требующий продуцирования антитела каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения по настоящему изобретению, можно получить различными методами, включая, но, не ограничиваясь перечисленным, метод гибридом, методы рекомбинантных ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов иммуноглобулинов человека, и такие методы и другие типичные методы получения моноклональных антител описаны в данном контексте.

«Природные антитела» относятся к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулина с различными структурами. Например, природные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой приблизительно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. В направлении от N-конца до C-конца, каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область (VH), так называемый вариабельный тяжелый домен или вариабельный домен тяжелой цепи, а затем три консервативных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, в направлении от N-конца до C-конца, каждая легкая цепь содержит вариабельную область (VL), так называемый вариабельный легкий домен или вариабельный домен легкой цепи, а затем консервативный домен легкой цепи (CL). Легкую цепь антитела можно отнести к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности ее консервативного домена.

Термин «вкладыш в упаковке» означает инструкции, обычно содержащиеся в коммерческих упаковках терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждения в отношении применения таких терапевтических продуктов.

«Идентичность аминокислотной последовательности в процентах (%)» в отношении эталонной полипептидной последовательности определяют как процентное содержание аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и при необходимости включения гэпов для обеспечения максимальной идентичности последовательностей в процентах и без учета любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей.

Выравнивание с целью определения идентичности аминокислотных последовательностей в % можно осуществлять различными способами, известными в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, которые требуются для достижения максимального выравнивания вдоль всей длины сравниваемых последовательностей. Однако согласно настоящему изобретению значения идентичности аминокислотных последовательностей в % определяют с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 создана фирмой Genentech Inc., и пользователь может найти исходный код в документации пользователей U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под номером U.S. Copyright Registration №TXU510087. Программа ALIGN-2 является

общедоступной на фирме Genentech, Inc., South San Francisco, Калифорния, или ее можно скомпилировать по исходному коду. Программу ALIGN-2 можно также скомпилировать для использования в операционной системе UNIX, включая управляющую программу UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены в программе  
 5 ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используют программу ALIGN-2, идентичность данной аминокислотной последовательности А в % с данной аминокислотной последовательностью В (которую в другом варианте можно назвать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или  
 10 включает определенную идентичность аминокислотной последовательности в % по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В) рассчитывают по формуле:

$$15 \quad 100 \times \text{частное } X/Y$$

где X означает число аминокислотных остатков, рассчитанных как идентичные совпадения при сравнении последовательностей А и В в программе ALIGN-2, и где Y означает общее число аминокислотных остатков в последовательности В. Следует  
 20 понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то идентичность в % при сравнении А с В не равна идентичности аминокислотной последовательности в % при сравнении В с А. Если специально не указано иное, все значения идентичности аминокислотных последовательностей в %, использованные в данном контексте, получены, как описано  
 25 в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин «фармацевтическая композиция» означает препарат, который в указанной форме обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в этом препарате и проявляющего эффективность, и который не содержит никаких дополнительных компонентов, оказывающих неприемлемую токсичность на организм  
 30 субъекта, которому вводят этот препарат.

«Фармацевтически приемлемый носитель» означает ингредиент в фармацевтической композиции, который не является активным ингредиентом и который не оказывает токсическое действие на субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но, не ограничиваясь только ими, буферное вещество, эксципиент, стабилизатор или  
 35 консервант.

Использованный в данном контексте термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечебный» или «терапия») означает клиническое вмешательство с целью изменить природный ход заболевания у индивидуума, нуждающегося в лечении, которое можно осуществлять либо для профилактики, либо в ходе клинической  
 40 патологии. Требуемые действия лечения включают, но, не ограничиваясь только ими, профилактику возникновения или рецидива заболевания, снижение интенсивности симптомов, снижение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, профилактику метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение патологического состояния, а также ремиссию  
 45 или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах антитела по настоящему изобретению используют для замедления прогрессирования заболевания.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» означает домен тяжелой цепи или легкой цепи антитела, который принимает участие в связывании антитела с

антигеном. Вариабельные домены тяжелой и легкой цепей (VH и VL, соответственно) природного антитела в основном характеризуются аналогичной структурой, причем каждый домен включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). См., например, статью Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6<sup>ое</sup> изд., W.H. Freeman and Co., с. 91 (2007). Для проявления антигенсвязывающей специфичности может быть достаточно одного VH или VL домена. Более того антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять с использованием VH или VL домена из антитела, которое связывается с антигеном для скрининга библиотеки комплементарных VL или VH доменов, соответственно. См., например, статьи Portolano S. и др., *J. Immunol.* 150 880-887 (1993); Clackson T. и др., *Nature* 352 624-628 (1991)).

Термин «вектор», использованный в данном контексте, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к размножению другой нуклеиновой кислоты, к которой она присоединена. Термин включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки хозяина, в которую он включен. Определенные векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном контексте названы «экспрессионными векторами».

#### I. Композиции и методы

В одном объекте настоящего изобретения основано на открытии того, что выбранные анти-HLA-G антитела по изобретению связываются с определенными эпитопами HLA-G с высокой специфичностью (не проявляют перекрестной реактивности к другим видам и консенсусным последовательностям HLA-A человека) и обладает способностью специфично ингибировать связывание ИЛТ2 и или ИЛТ4 с HLA-G. Они ингибируют, например, связывание ИЛТ2 с HLA-G и специфично обращают HLA-G-опосредованное подавление иммунного ответа за счет увеличения высвобождения иммуномодуляторных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  после соответствующей стимуляции, и они характеризуются отсутствием действия на HLAG-нокаунтные клетки.

В некоторых вариантах предлагаются антитела, которые связываются с HLA-G. Антитела по изобретению можно использовать, например, для диагностики или лечения рака.

#### A. Типичные анти-HLA-G антитела

В объекте настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G (анти- HLA-G антитело) и которое ингибирует связывание ИЛТ2 с HLAG на клетках JEG-3 (ATCC HTB36) и восстанавливает HLA-G-специфичный сниженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ )) из моноцитов, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36). Таким образом антитела по изобретению восстанавливают HLA-G-специфичное высвобождение TNF- $\alpha$  в стимулированных липополисахаридом (LPS) совместно культивируемых культурах, экспрессирующих HLA-G клетках JEG-3 (ATCC HTB36) и моноцитах по сравнению с необработанными совместно культивируемыми клетками JEG-3 (в качестве отрицательного контроля использовали необработанные культуры клеток, 0%, в качестве положительного контроля использовали культуры только моноцитов, 100%, в которых высвобождение TNF- $\alpha$  не подавляется любыми HLA-G/IL-Т2-специфичными эффектами (см. пример 7). И наоборот, антитела по настоящему изобретению не способны восстанавливать иммунный ответ в моноцитах, стимулированных липополисахаридом (LPS) в совместно культивируемых HLA-G нокаунтных культурах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное)

антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

5 А) (a) домен HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или

10 В) (a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или

15 С) (a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или

20 D) (a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

35 А) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 3, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и (iii) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или

40 В) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 11, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и (iii) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или

45 С) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, включающий аминокислотную

последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 19, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (ii) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и (iii) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или

5 D) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 27, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (ii) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и (iii) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается выделенное антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим

15 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

A)

(i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 8,

(ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i), или

20 (iii) включает последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 34, или

B)

(i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16, или

25 C)

(i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24, или D)

(i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

30 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(a) домен HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

40 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 and (f) HVR-L3,

включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим

5 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (e) HVR-L2,

10 включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ

15 ID NO: 43), где антитело включает

(a) HVR-H1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (b) HVR-H2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (c) HVR-H3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, (d) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (e) HVR-L2,

20 включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и (f) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим

25 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(i) последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 8, (ii) или гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. i). В одном

варианте осуществления настоящего изобретения предлагается

(выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим

30 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(i) последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 34.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ

35 ID NO: 43), где антитело включает

последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим

40 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ

45 ID NO: 43), где антитело включает

последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается

(выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M MHC I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

5 А) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и где VH домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична  
10 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 and (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, где VL домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%,  
15 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, или

В) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную  
20 последовательность SEQ ID NO: 11, где VH домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-  
25 L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 and (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, где (b) VL домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 или

30 С) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 19, и где VH домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%,  
35 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:  
40 22, где VL домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, или

45 D) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 27, и (b) где VH домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на

95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 and (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, где VL домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 and (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

20 и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 34, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

(a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 3, и где VH домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и где VL домен включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34,

45 и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается

не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 34, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса), и/или

- 5 где антитело независимо характеризуется следующими свойствами: анти-HLA-G антитело
- а) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или
  - 10 в) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 39 и последовательность SEQ ID NO: 37, и/или
  - с) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или
  - д) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС I крысы, 15 включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или
  - е) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или
  - ф) ингибирует связывание ILT2 с тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте 20 более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4б), и/или
  - г) ингибирует связывание ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4б), и/или
  - 25 h) ингибирует связывание (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример б), и/или
  - и) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (см. пример 5), и ингибирует связывание ILT2 с HLA-G на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем 30 на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример б), и/или
  - ж) ингибирует связывание CD8 с HLAG более чем на 80% (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4с), и/или
  - к) восстанавливает HLA-G-специфичный сниженный иммунный ответ (например, 35 сниженное высвобождение TNF- $\alpha$ ) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим 40 последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, включающее VH домен SEQ ID NO: 33 и VL домен SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело 45 связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

- (а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и (b) домен VL,

включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 and (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает

а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и где домен VH включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и где домен VL включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса), и/или,

где антитело независимо характеризуется следующими свойствами:

анти-HLA-G антитело

а) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или

б) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 и последовательность SEQ ID NO: 37, и/или

в) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или

д) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или

е) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I

(включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или

f) ингибирует связывание ИЛТ2 с тримерным комплексом HLA-G β2М МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43) более чем на 50% (в одном варианте более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

5 g) ингибирует связывание ИЛТ2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G β2М МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43) более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

10 h) ингибирует связывание ИЛТ2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (АТСС No. НТВ36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

i) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (АТСС No. НТВ36) (см. пример 5) и ингибирует связывание ИЛТ2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (АТСС No. НТВ36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

15 j) ингибирует связывание CD8a с HLAG более чем на 80% (по сравнению со связыванием без антитела) (см., например, пример 4c), и/или

20 k) восстанавливает HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF-α)) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (АТСС НТВ36).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G β2М МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, включающее последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16.

30 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G β2М МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает:

а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-L2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (iii) HVR-L3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

40 где антитело связывается с комплексом HLA-G β2М МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса).

45 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G β2М МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает:

- а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и где домен VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и где домен VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
- и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса), и/или,
- где антитело независимо характеризуется следующими свойствами:
- анти-HLA-G антитело
- а) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или
- б) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 39 и последовательность SEQ ID NO: 37, и/или
- с) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или
- е) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или
- ф) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или
- г) ингибирует связывание ILT2 с тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или
- h) ингибирует связывание ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или
- и) ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. НТВ36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или
- j) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. НТВ36) (см. пример 5), и ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. НТВ36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или
- к) ингибирует связывание CD8a с HLAG более чем на 80% (по сравнению со

связыванием без антитела) (см., например, пример 4 с), и/или

1) восстанавливает HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36).

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, включающее последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24.

10 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает:

15 а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, (ii) HVR-L2, содержащий

20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и

и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается

25 не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса).

30 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело включает:

а) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную

35 последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и где домен VH включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, и (b) домен VL, включающий (i)

40 HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и где домен VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% (в одном предпочтительном варианте на 98% или на 99%

45 или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32,

и где антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43, связывающая аффинность которого в основном идентична (в одном варианте связывающая аффинность, то есть значение KD, снижается

не более, чем в 10 раз по сравнению с антителом, включающим последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32, в другом варианте значение KD снижается не более, чем в 5 раз по сравнению с указанным антителом) (измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса), и/или

5 где антитело независимо характеризуется следующими свойствами:  
анти-HLA-G антитело

a) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или

10 b) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 37, и/или

c) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или

d) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или

15 e) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или

f) ингибирует связывание ILT2 с тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

20 g) ингибирует связывание ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

h) ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

i) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (см. пример 5) и ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

30 j) ингибирует связывание CD8a с HLAG более чем на 80% (по сравнению со связыванием без антитела) (см., например, пример 4c), и/или

k) восстанавливает HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается (выделенное) антитело, которое связывается с HLA-G человека (в одном варианте антитело связывается с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I, включающим последовательность SEQ ID NO: 43), где антитело связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, включающее VH с последовательностью SEQ ID NO: 31 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой изотип IgG1. В одном варианте антитело представляет собой изотип IgG1, включающий мутации L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU индексу Кабата).

45 В другом объекте анти-HLA-G антитело в соответствии с любым из описанных выше вариантов может включать любой из признаков, в отдельности или в комбинации, как описано ниже в разделах 1-7.

## 1. Аффинность антител

В определенных вариантах антитело, как описано в данном контексте, характеризуется константой диссоциации ( $K_D$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М).

В одном предпочтительном варианте величину определяли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием установки BIACORE<sup>®</sup> при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на чипы CM5 (уровень иммобилизации составлял приблизительно 10 условных единиц ответа (RU)). Краткое описание анализа: карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (CM5, фирмы BIACORE, Inc.) активировали гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями фирм-поставщиков. Антиген разбавляли 10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4,8, до концентрации 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) и затем его пропускали со скоростью потока 5 мкл/мин до достижения уровня приблизительно 10 условных единиц ответа (RU) связанного белка. После пропускания антигена вводили 1 М раствор этаноламина для блокировки непрореагировавших групп. Для измерения кинетических параметров вводили 2-кратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в буферном растворе PBST (буферный раствор ФСБ, включающий 0,05% ПАВ, полисорбат 20 (TWEEN-20<sup>™</sup>)) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорость ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ) и скорость диссоциации ( $k_{off}$  или  $k_d$ ) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра один к одному (программное обеспечение BIACORE<sup>®</sup> Evaluation, версия 3.2) с помощью одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали в виде отношения  $k_d/k_a$  ( $k_{off}/k_{on}$ ), см., например, статью Chen и др., J. Mol. Biol., 293, 865-881 (1999). Если по данным метода поверхностного плазмонного резонанса, как описано выше, скорость ассоциации превышает  $10^6$  М<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup>, то ее можно определять методом тушения флуоресценции, который позволяет измерять увеличение или уменьшение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм, испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C 20 нМ раствора антитела против антигена (Fab форма) в буферном растворе ФСБ, pH 7.2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена, измеряемых спектрофотометрически, например, с использованием спектрофотометра остановленного потока (фирмы Aviv Instruments) или спектрофотометра SLM-AMINCO<sup>™</sup> (фирмы ThermoSpectronic) серии 8000, оборудованный кюветой с перемешиванием.

## 2. Фрагменты антитела

В определенных вариантах антитело, как описано в данном контексте, представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антитела включают, но, не ограничиваясь только ими, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и scFv фрагменты, а также другие фрагменты, описанные ниже. См. обзор, в котором описаны определенные фрагменты антител (Hudson P. J. и др., Nat. Med., 9, сс. 129-134 (2003)). Обзорная характеристика scFv фрагментов приведен, например, в статье Pliickthun, в книге The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, Rosenburg и Moore изд., Springer-Verlag, New York, сс. 269-315 (1994), см. также заявку WO 93/16185 и патенты US 5571894 и US 5587458. Обсуждение свойств Fab и F(ab')<sub>2</sub> фрагментов, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, и характеризующихся повышенным периодом полураспада *in vivo*, приведено в патенте

US 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими участками, которые могут быть бивалентными или биспецифичными. См., например, патент EP 0404097, заявку WO 1993/01161, статьи Hudson P.J. и др., *Nat. Med.*, 9, сс. 129-134 (2003) и Hollinger P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, сс. 6444-6448 (1993). Тритела и тетратела описаны также в статье Hudson P.J. и др., *Nat. Med.*, 9, сс. 129-134 (2003).

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, включающие весь переменный домен тяжелой цепи или часть переменного домена тяжелой цепи или весь переменный домен легкой цепи или часть переменного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, MA, см., например, патент US 6248516 B1).

Фрагменты антител можно получить различными методами, включая, но, не ограничиваясь только ими, расщепление протеолитическими ферментами интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяина (например, *E. coli* или фаг), как описано в данном контексте.

### 3. Гибридные и гуманизированные антитела

В определенных вариантах антитело, как описано в данном контексте, представляет собой гибридное антитело. Определенные гибридные антитела описаны, например, в патенте US 4816567 и статье Morrison S.L. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6851-6855 (1984)). В одном примере гибридное антитело включает переменную область антител, не относящихся к антителу человека (например, переменную область получают из антител мыши, крысы, хомяка, кролика или нечеловекообразного примата, такого как обезьяна), и консервативную область антитела человека. В другом примере гибридное антитело представляет собой антитело "переключенного класса", в котором класс или подкласс был изменен (относительно) по сравнению с исходным антителом. Гибридные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В определенных вариантах гибридное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Обычно антитело, не относящееся к антителу человека, гуманизируют для снижения их иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела не относящегося к антителу человека. В основном гуманизированное антитело включает один или более переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) получены из антитела, не относящегося к антителу человека, а FR (или их части) получены из последовательностей антител человека. Гуманизированное антитело необязательно также может включать по меньшей мере часть консервативной области человека. В некоторых вариантах, некоторые аминокислотные остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки антитела, не относящегося к антителу человека (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или повышения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения представлены, например, в статье Almagro J.C. и Fransson J., *Front. Biosci.*, 13, 1619-1633 (2008), а также описаны, например, в статьях Riechmann I. и др., *Nature*, 332, 323-329 (1988), Queen C. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029-10033 (1989), патентах US 5821337, US 7527791, US 6982321 и US 7087409, статьях Kashmiri S.V. и др., *Methods*, 36, 25-34 (2005) (описана прививка SDR (a-CDR)), Padlan E.A., *Mol. Immunol.*, 28, 489-498 (1991) (описана "перекладка доменов"), Dall'Acqua, W.F. и др., *Methods*, 36, 43-60 (2005) (описана "перестановка FR") и Osbourn J. и др., *Methods*, 36, 61-68 (2005), а также Klimka A. и др., *Br. J. Cancer*, 83, 252-

260 (2000) (описана методика "направленной селекции" при перестановке FR).

Каркасные области антител человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, но, не ограничиваясь только ими: каркасные области, выбранные с использованием метода "наилучшего соответствия (наилучшей подгонки)" (см., например, статью Sims M.J. и др., *J. Immunol.*, 151, 2296-2308 (1993), каркасные области, полученные из консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы вариабельных областей легкой и тяжелой цепи (см., например, статьи Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 4285-4289 (1992) и Presta L.G. и др., *J. Immunol.*, 151 2623-2632 (1993)), зрелые (соматически мутированные) каркасные области антител человека или каркасные области эмбриональной линии человека (см., например, статью Almagro J.C. и Fransson J., *Front. Biosci.*, 13, 1619-1633 (2008)) и каркасные области, полученные при скрининге FR-библиотек (см., например, статьи Vasa M. и др., *J. Biol. Chem.*, 272 10678-10684 (1997) и Rosok M.J. и др., *J. Biol. Chem.*, 271, 22611-22618 (1996).

#### 4. Антитела человека

В определенных вариантах антитело, как описано в данном контексте, представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получить с использованием различных методов, известных специалисту в данной области техники. Антитела человека в основном описаны в статьях van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5, 368-374 (2001) и Lonberg N., *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 450-459 (2008).

Антитела человека можно получить при введении иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования интактных антител человека или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на сенсбилизацию антигеном. Указанные животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулина или которые присутствуют вне хромосом или интегрированы случайным образом в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Подробное описание методов получения антител человека в трансгенных животных см. в статье Lonberg N., *Nat. Biotech.*, 23, 1117-1125 (2005). См. также, например, патенты US 6075181 и US 6150584, где описана технология XENOMOUSE™, патент US 5770429, где описана технология H<sub>U</sub>M<sub>AB</sub>®, патент US 7041870, где описана технология K-M MOUSE®, а также заявку US 2007/0061900, где описана технология VELOCIMOUSE. Вариабельные области интактных антител человека, полученные в указанных животных, можно дополнительно модифицировать, например, комбинируя с другой консервативной областью антитела человека.

Антитела человека также можно получить методами на основе гибридом. В литературе описаны клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продуцирования моноклональных антител человека (см., например, статью Kozbor D., *J. Immunol.*, 133 3001-3005 (1984), работу Brodeur B.R. и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63 (1987), и статью Voerner P. и др., *J. Immunol.*, 147, 86-95 (1991)). Антитела человека, полученные по технологии гибридом В-клеток человека, также описаны в статье Li, J. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 3557-3562 (2006). Дополнительные способы, включают способы, описанные, например, в патенте US 7189826 (где описано получение моноклональных IgM антител человека с использованием клеточных линий гибридом) и статье Ni J., *Xiandai Mianyixue*, 26, 265-268 (2006) (где описаны гибридомы человек-человек). Технология гибридом человека (технология Trioma) описана также в статье Vollmers

Н.Р. и Brandlein S., *Histology and Histopathology*, 20, 927-937 (2005) и работе Vollmers Н.Р. и Brandlein S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27, 185-191 (2005).

5 Антитела человека можно также получить при выделении последовательностей  
 5 переменных доменов Fv-клонов, выбранных из библиотек фагового дисплея антител  
 человека. Указанные последовательности переменных доменов затем можно  
 объединить с требуемым консервативным доменом антитела человека. Методики  
 выбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

5. Антитела, полученные с использованием библиотек

10 Антитела по настоящему изобретению можно выделить с использованием скрининга  
 комбинаторных библиотек для антител с требуемой активностью или активностями.  
 Например, в данной области техники известно множество способов создания библиотек  
 фагового дисплея и скрининга таких библиотек для антител, обладающих требуемыми  
 характеристиками связывания. Указанные способы описаны, например, в обзоре  
 15 Hoogenboom H.R. и др., *Methods in Molecular Biology*, 178, 1-37 (2001), и дополнительно  
 описаны, например, в статьях McCafferty J. и др., *Nature*, 348, 552-554 (1990), Clackson T.  
 и др., *Nature*, 352, 624-628 (1991), Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597 (1992), Marks  
 J.D. и Bradbury A., *Methods in Molecular Biology*, 248, 161-175 (2003), Sidhu S.S. и др., *J.*  
*Mol. Biol.*, 338, 299-310 (2004), Lee C.V. и др., *J. Mol. Biol.*, 340, 1073-1093 (2004), Fellouse  
 20 F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 12467-12472 (2004) и Lee C.V. и др., *J. Immunol. Methods*,  
 284, 119-132 (2004).

В определенных способах фагового дисплея репертуары генов VH и VL отдельно  
 клонируют с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и произвольным  
 образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, и затем проводят их скрининг для  
 25 антигенсвязывающего фага, как описано в статье Winter G. и др., *Ann. Rev. Immunol.*,  
 12, 433-455 (1994). Как правило, фаги отображают фрагменты антител либо в виде  
 одноцепочечных Fv (scFv) фрагментов, либо в виде Fab фрагментов. Библиотеки из  
 иммунизированных источников предоставляют высокоаффинные антитела в отношении  
 иммуногена без необходимости конструирования гибридом. В другом варианте можно  
 30 клонировать "наивный" репертуар (например, человека), чтобы обеспечить единый  
 источник антител к широкому диапазону "чужеродных", а также "собственных"  
 антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в статье Griffiths A.D. и др., *EMBO*  
*J.*, 12, 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки также можно получить  
 синтетическим методом при клонировании сегментов неперегруппированного V-гена  
 35 из стволовых клеток, а также с использованием ПЦР-праймеров, содержащих случайную  
 последовательность, с тем, чтобы кодировать высоковариабельные CDR3 области и  
 осуществить перегруппировку *in vitro*, как описано в статье Hoogenboom H.R. и Winter  
 G., *J. Mol. Biol.*, 227, 381-388 (1992). Фаговые библиотеки антител человека описаны,  
 например, в патенте US 5750373 и заявках US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/  
 40 0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 и US 2009/  
 0002360.

Антитела или фрагменты антитела, выделенные из библиотек антител человека,  
 рассматриваются в данном контексте, как антитела человека или фрагменты антител  
 человека.

45 6. Мультиспецифичные антитела

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, как  
 описано в данном контексте, представляет собой мультиспецифичное антитело,  
 например, биспецифичное антитело. Мультиспецифичные антитела представляют собой

моноклональные антитела, которые характеризуются связывающимися специфичностями в отношении по меньшей мере двух различных сайтов. В определенных вариантах одна связывающая специфичность относится к связыванию с HLA-G, а другая специфичность относится к любому другому антигену. Биспецифичные антитела можно  
5 получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики получения мультиспецифичных антител включают, но, не ограничиваясь только ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, которые характеризуются различающимися специфичностями (см. статью Milstein С. и Cuello А.С, Nature, 305, 537-540 (1983), заявку WO 93/08829 и  
10 статью Traunecker А. и др., EMBO J., 10, 3655-3659 (1991)), а также создание конструкций типа "выступ-во-впадину" ("knob-in-hole", см., например, патент US 5731168).

Мультиспецифичные антитела также можно получить при конструировании с использованием эффектов электростатического взаимодействия для создания Fc-гетеродимерных молекул антител (см. заявку WO 2009/089004), с использованием  
15 перекрестной сшивки двух или более антител или фрагментов (см., например, патент US 4676980 и статью Brennan М. и др., Science, 229, 81-83 (1985)), с использованием "лейциновых молний" для получения биспецифичных антител (см., например, статью Kostelny S.A. и др., J. Immunol., 148, 1547-1553 (1992)), при использовании технологии "диател" для получения биспецифичных фрагментов антител (см., например, статью  
20 Hollinger Р. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)), а также при использовании димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, статью Gruber М. и др., J. Immunol., 152, 5368-5374 (1994)), и получении триспецифичных антител, как описано, например, в статье Tutt А. и др., J. Immunol., 147, 60-69 (1991)).

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными  
25 антигенсвязывающими сайтами, включая "антитела-осьминоги (octopus antibodies)", также включены в настоящее описание (см., например, заявку US 2006/0025576).

Антитело или фрагмент, как описано в данном контексте, также включает "FAB двойного действия" или "DAF", включающий антигенсвязывающий сайт, который связывается с HLA-G, а также с другим отличающимся антигеном (см., например, заявку  
30 US 2008/0069820).

Антитело или фрагмент, как описано в данном контексте, также включают мультиспецифичные антитела, описанные в заявках WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 и WO 2010/145793, WO 2011/117330, WO 2012/025525, WO 2012/025530,  
35 WO 2013/026835, WO 2013/026831, WO 2013/164325 или WO 2013/174873.

## 7. Варианты антител

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предполагаются варианты аминокислотной последовательности антител, описанных в данном контексте. Например, может потребоваться улучшить связывающую аффинность и/или другие  
40 биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получить за счет осуществления соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или в результате пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любую комбинацию  
45 делеции, вставки и замены можно использовать для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, антигенсвязывающими свойствами. а) Варианты замены, вставки и делеции аминокислот В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения

предлагаются варианты антитела, содержащие одну или более аминокислотных замен. Исследуемые сайты для заместительного мутагенеза, включают HVR и FR. Типичные изменения приведены в таблице 1 в столбце "Типичные замены", и описаны ниже с указанием типов боковых групп в составе аминокислоты. Консервативные замены приведены в таблице 1 в столбце "Предпочтительные замены". Аминокислотные замены можно вводить в исследуемое антитело, и продукты можно подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохраненного/улучшенного связывания с антигеном, сниженной иммуногенностью или улучшенной ADCC или CDC.

Таблица 1

Исходный остаток	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys

Исходный остаток	Типичные замены	Предпочтительные замены
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Аминокислоты можно сгруппировать в соответствии с общими свойствами боковой группы:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile,
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
- (3) кислотные: Asp, Glu,
- (4) основные: His, Lys, Arg,
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro,
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса.

Один из типов варианта с заменами включает замену одного или более остатков в

гипервариабельных участках исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант (варианты), выбранный для последующего изучения, будет характеризоваться модификациями (например, улучшением) некоторых биологических свойств (например, 5 характеризоваться повышенной аффинностью, пониженной иммуногенностью) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохранит определенные биологические свойства исходного антитела. Типичным вариантом с заменой является антитело с "созревшей аффинностью", которое можно получить простым методом, например, с использованием методов "созревания аффинности", основанных на 10 применении фагового дисплея, как описано в данном контексте. Краткое описание: один или более остатков HVR подвергаются мутации и проводят скрининг вариантов антитела, отображаемых фагом, для выявления антител с определенной биологической активностью (например, связывающей аффинностью).

Изменения (например, замены) можно выполнять в HVR, например, для улучшения 15 аффинности антитела. Указанные изменения можно проводить в "горячих точках мутагенеза" HVR, т.е. в остатках, кодируемых кодонами, которые в процессе соматического созревания с высокой частотой подвергаются мутациям (см., например, статью Chowdhury P.S., *Methods Mol. Biol.*, 207, 179-196 (2008)), и/или SDR (а-CDR), при этом полученный вариант VH или VL тестируют в отношении связывающей аффинности. 20 Осуществление аффинного созревания с помощью конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано, например, в статье Hoogenboom H.R. и др. в книге *Methods in Molecular Biology*, 178, 1-37 (2002). В некоторых вариантах метода созревания аффинности в вариабельные гены, выбранные для созревания, вносят разнообразно любым из ряда способов (например, ПЦР сниженной точности, 25 перестановки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг данной библиотеки для идентификации любых вариантов антитела с требуемой аффинностью. Другой способ внесения разнообразия включает HVR-направленные подходы, при которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков одновременно). Остатки HVR, 30 участвующие в связывании антигена, можно специфически идентифицировать, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Особенно часто мишенью становятся CDR-H3 и CDR-L3.

В определенных вариантах замены, вставки или делеции можно осуществлять в пределах одного или более HVR при условии, что такие изменения существенно не 35 снижают способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR можно вносить консервативные изменения (например, консервативные замены, как описано в данном контексте), которые существенно не снижают связывающую аффинность. Указанные изменения можно располагать за пределами "горячих точек" HVR или SDR. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в составе вариантов 40 последовательностей VH и VL, приведенных выше, каждый HVR либо остается без изменений, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Пригодным способом определения остатков или участков антитела, которые могут служить в качестве мишеней мутагенеза, является "аланин-сканирующий мутагенез", описанный в статье Cunningham B.C. и Wells J.A., *Science*, 244, 1081-1085 (1989). В 45 указанном способе идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как остатки arg, asp, his, lys и glu) и заменяют на остатки нейтральной или отрицательно заряженной аминокислоты (например, аланин или полиаланин), чтобы определить, повлияет ли такая замена на взаимодействие антитела

с антигеном. В положениях аминокислот, проявляющих функциональную чувствительность к первоначальным заменам, можно осуществлять дальнейшие замены. В другом варианте или дополнительно можно провести анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для выявления точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактирующие остатки и соседние с ними остатки можно выбрать в качестве кандидатов на замену или исключить их. Варианты можно подвергать скринингу, чтобы определить, характеризуются ли они требуемыми свойствами.

Вставки аминокислотной последовательности включают присоединяемые к N- и/или C-концевому остатку вставки длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина. Другие варианты молекулы антитела со вставками включают молекулы, где к N-или C-концевому остатку антитела присоединен фермент (например, для ADEPT) или полипептид, который увеличивает период полураспада антитела в сыворотке.

#### б) Варианты Fc области

В определенных вариантах одну или более модификаций аминокислот можно осуществить в Fc-области антитела, как описано в данном контексте, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может включать последовательность Fc-области антитела человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую модификацию аминокислоты (например, замену) в одном или нескольких положениях аминокислот.

Антитела, характеризующиеся сниженной эффекторной функцией, включают антитела с заменой одного или более остатков в положениях 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в Fc-области (см. патент US 6737056). Такие мутированные Fc включают мутированные Fc с заменами двух или более остатков в положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый "DANA" мутированный Fc, в котором аминокислотные остатки в положении 265 и 297 заменены на аланин (см. патент US 7332581).

Определенные варианты антител, характеризующиеся повышенным или уменьшенным связыванием с FcR, описаны в литературе (см., например, патент US 6737056, заявку WO 2004/056312 и статью Shields R.L. и др., J. Biol. Chem., 276, 6591-6604 (2001)).

В одном варианте изобретения указанное антитело представляет собой IgG1, которое содержит мутации L234A и L235A или мутации L234A, L235A и P329G. В другом варианте антитело представляет собой IgG4, которое содержит мутации S228P и L235E или S228P, L235E или/и P329G (нумерация согласно EU индексу Кабата, как описано в статье Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>0e</sup> изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Антитела с увеличенным периодом полураспада и улучшенным связыванием с неонатальным Fc рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (см. статьи Guyer R.L. и др., J. Immunol., 117, 587-593 (1976), и Kim J.K. и др., J. Immunol., 24, 2429-2434 (1994)), описаны в заявке US 2005/0014934. Указанные антитела содержат Fc область с одной или несколькими заменами, которые приводят к улучшению связывания Fc области с FcRn. Указанные варианты Fc включают варианты с заменами одного или более остатков Fc области в положениях: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, с заменой в Fc области остатка в положении 434 (см. патент US 7371826).

Описание других примеров вариантов Fc области смотри также в статье Duncan A.R.

и Winter G., Nature, 322, 738-740 (1988), патентах US 5648260, US 5624821 и заявке WO 94/29351.

с) Варианты сконструированных антител, содержащие цистеин

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения целесообразным является конструирование модифицированных цистеином антител, например, "thioMAbs", в которых один или несколько остатков антитела заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения заменяемые остатки располагаются в доступных сайтах антитела. При замене этих остатков на цистеин реакционно-способные тиоловые группы расположены в доступных сайтах антитела и их можно использовать для конъюгирования антитела с другими фрагментами, например, такими как фрагменты в виде лекарственного средства или фрагменты в виде лекарственного средства, соединенного с линкером, для создания иммуноконъюгата, как описано ниже в данном контексте. В определенных вариантах на цистеин можно заменить любой один или более из следующих остатков: V205 (по системе нумерации Кабата) в легкой цепи, A118 (по системе EU нумерации) в тяжелой цепи и S400 (по системе EU нумерации) в Fc-области тяжелой цепи. Сконструированные антитела, содержащие цистеин, можно получить, как описано, например, в патенте US 7521541.

d) Производные антител

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, описанное в данном контексте, можно дополнительно модифицировать с тем, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области техники и легко доступны. Компоненты, пригодные для получения производных антитела, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваясь только ими. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но, не ограничиваясь только ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (как гомополимеры, так и статистические сополимеры) и декстран или поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущества при получении ввиду его стабильности в воде. Полимер может характеризоваться любой молекулярной массой и может представлять собой разветвленный или неразветвленный полимер. Число полимеров, присоединяемых к антителу, можно изменять, и если присоединяется больше одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или различные соединения. В общем случае число и/или тип полимеров, используемых для получения производных, можно определить исходя из соображений, включающих, но, не ограничиваясь только ими, конкретные свойства или функции антитела, которые нуждаются в улучшении и с учетом применения производного антитела в терапии при определенных условиях, и т.д.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагаются конъюгаты антитела и фрагментов небелковой природы, которые можно селективно нагреть при воздействии излучения. В одном варианте фрагмент небелковой природы представляет собой углеродную нанотрубку (см. статью Kam N.W. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 11600-11605 (2005)). Излучение может иметь любую длину волны и включает, но, не ограничиваясь только ими, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают фрагмент небелковой природы до температуры, при которой

клетки, расположенные в непосредственной близости от фрагмента небелковой природы в составе антитела, погибают.

#### В. Рекомбинантные способы и композиции

Антитела можно получать с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте US 4816567. В одном варианте предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-HLA-G антитело, как описано в данном контексте. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, включающую VL, и/или аминокислотную последовательность, включающую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом варианте предлагается один или более векторов (например, экспрессионные векторы), включающих указанную нуклеиновую кислоту. В еще одном варианте предлагается клетка хозяина, которая включает указанную нуклеиновую кислоту. В одном указанном варианте клетка хозяина включает, например, клетку, трансформированную с использованием: (1) вектора, включающего нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и аминокислотную последовательность, включающую VH антитела, или (2) первого вектора, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и второго вектора, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VH антитела. В одном варианте клетка хозяина представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку клеточной линии HEK293 или лимфоидную клетку (например, клетку клеточных линий Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения анти-HLA-G антитела, где способ включает культивирование клетки хозяина, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как описано выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки хозяина (или среды культивирования клетки хозяина).

Для продуцирования рекомбинантного анти-HLA-G антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанное выше в данном контексте, выделяют и встраивают в один или более векторов для последующего клонирования и/или экспрессии в клетке хозяина. Указанную нуклеиновую кислоту можно выделить простым методом и секвенировать с использованием стандартных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Клетки хозяина, пригодные для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, как описано в данном контексте. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, прежде всего, когда нет необходимости в гликозилировании и Fc-эффекторной функции. Информацию об экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты US 5648237, US 5789199 и US 5840523 (см. также работу Charlton K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, 245-254 (2003) (изд. В.К.С. Lo, Humana Press, Totowa, NJ), где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело можно выделить из биомассы бактериальных клеток в растворимой фракции и в дальнейшем можно очистить.

Помимо прокариот, пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что позволяло получить антитело

с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. статьи Gerngross T.U., *Nat. Biotech.*, 22, 1409-1414 (2004) и Li H. и др., *Nat. Biotech.*, 24, 210-215 (2006).

5 Клетки хозяина, пригодные для экспрессии гликозилированного антитела, также получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать совместно с клетками насекомых, прежде всего, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

10 Культуры растительных клеток также можно использовать в качестве хозяев. См., например, патенты US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429 (где описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных также можно использовать в качестве хозяев. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами используемых линий клеток хозяев млекопитающих являются  
 15 линия CV1 клеток почки обезьяны, трансформированных SV40 (COS-7), линия клеток эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, описанные, например, в статье Graham F.L. и др., *J. Gen Virol.*, 36, 59-74 (1977)), клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки опухоли Сертоли мыши (клетки ТМ4, описанные, например, в статье Mather J.P., *Biol. Reprod.*, 23, 243-252 (1980)), клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки  
 20 африканской зеленой обезьяны (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HELA), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени крысы Buffalo (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI, описанные, например, в статье Mather J.P. и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 44-68 (1982), клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие клеточные  
 25 линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев, включают клетки яичников китайского хомяка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub G. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216-4220 (1980)), и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Подробное описание некоторых линий клеток хозяина млекопитающих, пригодных для получения антител, см., например, в работе Yazaki P. и Wu A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, 255-268 (2004) (изд. Lo, B.K.C., Humana Press, Totowa, NJ).

### С. Анализы

35 Анти-HLA-G антитела, описанные в данном контексте, можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать в отношении их физико-химических свойств и/или биологических активностей с использованием различных методов анализа, известных в данной области техники.

#### 1. Анализы связывания и другие анализы

В одном объекте оценивают антигенсвязывающую активность антитела по настоящему изобретению, например, с помощью известных методов, таких как (твердофазный иммуоферментный анализ) ИФА, вестерн-блоттинг и т.д.

40 В другом объекте можно использовать конкурентные анализы для идентификации антитела, которое конкурирует с HLA-G-0031 (включающим VH с последовательностью SEQ ID NO: 7 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 8) за связывание с HLA-G. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается антитело, которое конкурирует за связывание с HLA-G человека с анти-HLA-G антителом, включающим  
 45 все 3 HVR последовательности VH SEQ ID NO: 7 и все 3 HVR последовательности VL SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах указанное конкурирующее антитело связывается с одним и тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывается с анти-HLA-G антителом HLA-G-0031. В одном

варианте предлагается анти-HLA-G антитело, которое связывается с одним и тем же эпитопом на HLA-G, что и антитело, включающее VH с последовательностью SEQ ID NO: 7 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом объекте конкурентные анализы можно использовать для идентификации антитела, которое конкурирует с HLA-G-0090 (содержащим VH с последовательностью SEQ ID NO: 31 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 32) за связывание с HLA-G. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается антитело, которое конкурирует за связывание с HLA-G человека с анти-HLA-G антителом, которое включает все 3 HVR последовательности VH SEQ ID NO: 31 и все 3 HVR последовательности VL SEQ ID NO: 32. В определенных вариантах указанное конкурирующее антитело связывается с одним и тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывается с анти-HLA-G антителом HLA-G-0090. В одном варианте предлагается анти-HLA-G антитело, которое связывается с одним и тем же эпитопом на HLA-G, что и антитело, включающее VH с последовательностью SEQ ID NO: 31 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 32. Подробное описание типичных методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено в работе Morris G.E. (ред.), *Epitope Mapping Protocols*, в: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

В типичном способе конкурентного анализа иммобилизованный HLA-G инкубируют в растворе, который содержит первое меченое антитело, которое связывается с HLA-G (например, анти-HLA-G антитело HLA-G-0090), и второе немеченое антитело, которое исследуют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с HLA-G. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля используют иммобилизованный HLA-G, который инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержит второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с HLA-G, избыток несвязавшегося антитела удаляют и измеряют количество меченого антитела, связавшегося с иммобилизованным HLA-G. Если количество меченого антитела, связавшегося с иммобилизованным HLA-G, существенно снижается в исследуемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с HLA-G. См. руководство Harlow E. и Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, глава 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Описание другого типичного конкурентного анализа см. в примере 2 (ИФА для картирования эпитопа/конкурентный анализ связывания).

## 2. Методы анализа активности

В одном объекте предлагаются методы анализа для идентификации анти-HLA-G антител, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, способность усиливать активацию и/или пролиферацию различных иммунных клеток, включая Т-клетки. Например, они усиливают высвобождение иммуномодулирующих цитокинов (например, интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ )). Другими иммуномодулирующими цитокинами, которые усиливают или могут усиливать связывание с разными типами клеток, являются, например, IL1 $\beta$ , IL6, IL12, гранзим В и т.п. Предлагаются также антитела, проявляющие указанную биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*.

В определенных вариантах антитело по настоящему изобретению исследуют в отношении указанной биологической активности, например, как описано ниже в разделе "Примеры".

Д. Иммуноконъюгаты (только для терапии рака или модификации мишени)

В изобретении также предлагаются иммуноконъюгаты, содержащие анти-HLA-G антитело, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные препараты, агенты, ингибирующие рост (клеток), токсины (например, токсины белковой природы, ферментативно активные токсины бактерий, грибов, растений или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном варианте иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или более лекарственными средствами, включая, но, не ограничиваясь только ими, майтанзиноид (см. патенты US 5208020, US 5416064 и EP 0425235 B1), ауристатин, например, лекарственные фрагменты DE и DF монометилауристатина (ММАЕ и ММАF) (см. патенты US 5635483, US 5780588 и US 7498298), доластатин, калихеамицин или их производные (см. патенты US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001 и US 5877296, статьи Hinman L.M. и др., *Cancer Res.*, 53, 3336-3342 (1993) и Lode H.N. и др., *Cancer Res.*, 58, 2925-2928 (1998)), антрациклин такой, как дауномицин или доксорубицин (см. статьи Kratz F. и др., *Curr. Med. Chem.*, 13, 477-523 (2006), Jeffrey S.C. и др., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 358-362 (2006), Torgov M.Y. и др., *Bioconjug. Chem.*, 16, 717-721 (2005), Nagy A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 829-834 (2000), Dubowchik G.M. и др., *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 12, 1529-1532 (2002), King H.D. и др., *J. Med. Chem.*, 45, 4336-4343 (2002), а также патент US 6630579), метотрексат, виндезин, таксан, такой, как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел, трихотецен и CC1065.

В другом варианте иммуноконъюгат включает антитело, как описано в данном контексте, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но, не ограничиваясь только ими, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, ретстриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте иммуноконъюгат включает антитело, как описано в данном контексте, конъюгированное с радиоактивным атомом, с образованием радиоактивного конъюгата. Для получения радиоактивных конъюгатов можно использовать различные радиоактивные изотопы. Примеры изотопов включают  $Ai^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $R^{186}$ ,  $R^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивный изотоп Lu. Если радиоактивный конъюгат применяется для детекции, он может содержать радиоактивный изотоп для проведения сцинтиграфического исследования, например,  $Tc^{99m}$  или  $I^{123}$ , или спиновую метку для проведения исследования методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного под названием магниторезонансная томография, МРТ, например, иод-123, иод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо).

Конъюгаты антитела с цитотоксическим агентом можно получать с применением различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие, как диметиладипимидат HCl), активированные эфиры (такие, как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие, как глутаровый альдегид), бис-

азидосоединения (такие, как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие, как бис(пара-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие, как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активированные соединения фтора (такие, как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получить, как описано в статье Vitetta E.S. и др., Science, 238, 1098-1104 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдизэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. заявку WO 94/11026. Линкер может представлять собой "отщепляемый линкер", который обеспечивает высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотолabile линкер, линкер, отщепляемый пептидазой, фотолabile линкер, диметилловый линкер или линкер, включающий дисульфидную группу (см. статью Chari R.V. и др., Cancer Res., 52, 127-131 (1992), патент US 5208020).

Иммуноконъюгаты или ADC, как описано в данном контексте, включают, но не ограничиваясь только ими, конъюгаты, полученные с использованием сшивающих реагентов, включающих, но не ограничиваясь только ими, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил(4-винилсульфон)бензоат), являющихся коммерчески доступными препаратами (например, фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., США).

#### Е. Способы и композиции для диагностики и детекции

В определенных вариантах любое из анти-HLA-G антител, предложенных в данном контексте, можно использовать для обнаружения HLA-G в биологическом образце. Термин "детекция", использованный в данном контексте, включает количественное или качественное определение. В определенных вариантах биологический образец включает клетку или ткань, такие, как инфильтраты иммунных клеток или Т-клеток и/или опухолевые клетки.

В одном варианте предлагается анти-HLA-G антитело для применения в способе диагностики или детекции. В другом объекте предлагается способ обнаружения HLA-G в биологическом образце. В определенных вариантах способ включает контактирование биологического образца с анти-HLA-G антителом, как описано в данном контексте, в условиях, обеспечивающих связывание анти-HLA-G антитела с HLA-G, и детекцию образования комплекса между анти-HLA-G антителом и HLA-G. Указанный способ может представлять собой способ для применения *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте анти-HLA-G антитело используют для отбора субъектов, пригодных для лечения анти-HLA-G антителом, например, где HLA-G представляет собой биомаркер для отбора пациентов.

В определенных вариантах предлагаются меченые анти-HLA-G антитела. Метки включают, но не ограничиваясь только ими, детектируемые напрямую метки или фрагменты (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие, как ферменты или лиганды, которые детектируются опосредовано, например, с использованием ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Типичные метки включают, но не ограничиваясь только ими, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светлячков и бактериальную люциферазу (см. патент US 4737456), люциферин, 2,3-

дигидрофталазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахарид-оксидазы, например, глюкозо-оксидазу, галактозо-оксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантин-оксидаза, связанные с ферментом, использующим пероксид водорода для окисления предшественника красителя, таким как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

#### Е. Фармацевтические составы

Фармацевтические составы анти-HLA-G антитела, как описано в данном контексте, получают смешивая указанное антитело, характеризующееся требуемой степенью чистоты, с одним или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. под ред. А. Osol (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, но не ограничиваясь только ими: буферные растворы, такие как фосфатный, цитратный буферные растворы, а также буферные растворы на основе других органических кислот, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и жеддаа-крезол), низкомолекулярные полипептиды (содержащие менее приблизительно 10 остатков), белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поли(винилпирролидон), аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как EDTA, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, содержащие металл комплексы (например, Zn-белковые комплексы), и/или неионогенные ПАВ, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Типичные фармацевтически приемлемые носители по настоящему изобретению дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в интерстициальном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активированные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, фирмы Baxter International, Inc.).

35 Определенные типичные sHASEGP и методы их применения, включая rhuPH20, описаны в заявках US 2005/0260186 и US 2006/0104968. В одном объекте изобретения sHASEGP объединяют с одной или более дополнительных гликозаминогликаназ, такими как хондроитиназы.

Типичные лиофилизированные составы антител описаны в патенте US 6267958. Водные составы антител включают составы, описанные в патенте US 6171586 и заявке WO 2006/044908, при этом последние включают гистидин-ацетатный буферный раствор.

Состав, как описано в данном контексте, также может содержать более одного активного ингредиента, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению состояния, предпочтительно вещества с взаимодополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, может потребоваться дополнительное введение. Указанные активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для решения поставленной задачи.

Активные ингредиенты можно включать в микрокапсулы, например, полученные с помощью способов коацервации или межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Указанные способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. А. Osol (1980).

Можно получить препараты с замедленным (продолженным) высвобождением. Пригодные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело, причем матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность можно обеспечивать простым способом, например, при фильтрации через стерильные мембраны для фильтрации.

#### G. Методы лечения и терапевтические композиции

Любое из анти-HLA-G антител (или антигенсвязывающий белков), описанное в данном контексте, можно использовать в способах лечения.

В одном объекте настоящего изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в качестве лекарственного средства. В других объектах предлагается анти-HLA-G антитело для применения при лечении рака. В определенных вариантах предлагается анти-HLA-G антитело для применения в способе лечения. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в способе лечения индивидуума, страдающего от рака, который включает введение индивидууму эффективного количества анти-HLA-G антитела.

В других вариантах изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в качестве иммуномодулятора для прямой или опосредованной индукции пролиферации, активации иммунных клеток (например, за счет высвобождения иммуностимулирующих цитокинов, таких как TNF-альфа (TNF $\alpha$ ) и IFN-гамма (IFN $\gamma$ ), или дополнительной миграции иммунных клеток). В определенных вариантах настоящего изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в способе иммуномодуляции для прямой или опосредованной индукции пролиферации, активации иммунных клеток, например, за счет высвобождения иммуностимулирующих цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , или дополнительной миграции иммунных клеток у индивидуума, и способ включает введение индивидууму эффективного анти-HLA-G антитела для иммуномодуляции/ для прямой или опосредованной индукции пролиферации, активации иммунных клеток, например, за счет высвобождения иммуностимулирующих цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , или дополнительной миграции иммунных клеток.

В других вариантах изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в качестве иммуностимулирующего агента или агента, стимулирующего высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ). В определенных вариантах изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения в способе иммуномодуляции для прямой или опосредованной индукции пролиферации, активации клеток, например, за счет высвобождения иммуностимулирующих цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IFN- $\gamma$  или дополнительной миграции иммунных клеток у индивидуума, и способ включает введение индивидууму эффективного анти-HLA-G антитела для иммуномодуляции для прямой или опосредованной индукции пролиферации, активации клеток, например, за счет высвобождения иммуностимулирующих цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IFN- $\gamma$  или

дополнительной миграции иммунных клеток.

В других вариантах изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения для ингибирования иммуносупрессии в опухолях (опухолевых клетках). В других вариантах изобретения предлагается анти-HLA-G антитело для применения для  
5 восстановления HLA-G-специфичного сниженного иммунного ответа (например, высвобождение цитокина иммунными клетками (например, TNF- $\alpha$  моноцитами)).

Термин "индивидуум" в соответствии с любым из описанных выше вариантов предпочтительно обозначает человека. В другом объекте настоящего изобретения предлагается применение анти-HLA-G антитела при производстве или получении  
10 лекарственного средства. В одном варианте лекарственное средство предназначено для лечения рака. В другом варианте лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения рака, включающем введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества лекарственного средства. В другом варианте лекарственное средство предназначено для индукции клеточно-опосредованного лизиса  
15 раковых клеток. В другом варианте лекарственное средство предназначено для применения в способе индукции клеточно-опосредованного лизиса раковых клеток у индивидуума, страдающего от рака, и указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества лекарственного средства для индукции апоптоза раковой клетки или для ингибирования пролиферации раковых клеток. Термин "индивидуум"  
20 в соответствии с любым из описанных выше вариантов может обозначать человека.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается способ лечения рака. В одном варианте способ включает введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества анти-HLA-G антитела. Термин "индивидуум" в соответствии с любым из описанных выше вариантов может обозначать человека.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается способ индукции клеточно-опосредованного лизиса раковых клеток у индивидуума, страдающего от рака. В одном варианте способ включает введение индивидууму эффективного количества анти-HLA-G антитела для индукции клеточно-опосредованного лизиса раковых клеток у индивидуума, страдающего от рака. Термин "индивидуум" в одном варианте обозначает  
30 человека.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается фармацевтические составы, включающие любые анти-HLA-G антитела, предложенные в данном контексте, например, для применения в любых описанных выше способах лечения. В одном варианте фармацевтический состав включает любые анти-HLA-G антитела,  
35 предложенные в данном контексте, и фармацевтически приемлемый носитель.

Антитело по изобретению (а также любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любыми пригодными способами, включающими парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, а при необходимости местное лечение, внутриочаговое введение. Парентеральные вливания включают внутримышечное,  
40 внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение препаратов можно осуществлять любым пригодным способом, например, в виде инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или длительным. В настоящем описании предлагаются различные схемы введения препаратов, включая, но не  
45 ограничиваясь только ими, однократное или многократное введение через различные периоды времени, струйное и импульсное вливание.

Антитела по изобретению можно перерабатывать, дозировать и вводить в соответствии с правилами надлежащей медицинской практики (GMP). Факторы,

рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, нуждающееся в лечении, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, участок, в который необходимо доставить агент, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим  
5 врачам. Антитело можно, но не обязательно, включать в состав, в сочетании с одним или более агентов, которые в настоящее время применяют для профилактики или  
лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или способа лечения, а также других факторов, описанных выше. Их обычно используют  
10 в тех же дозах и вводят теми же способами, как описано в данном контексте, или в дозах, составляющих приблизительно от 1 до 99% дозировок, описанных в данном контексте, или в любой дозе и любым способом, которые по данным эмпирических/  
клинических испытаний являются приемлемыми.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза антитела по  
15 изобретению (при использовании в отдельности или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, при этом антитело вводят для профилактических или терапевтических целей, в зависимости от  
предшествующих способов лечения, истории болезни пациента и ответной реакции на  
20 антитело и от мнения лечащего врача. Антитело вводят пациенту пригодным способом введения с использованием однократного или многократного введения. В зависимости от типа и тяжести заболевания антитело можно вводить в начальной дозе,  
рекомендованной для введения пациентам, которая находится в диапазоне от  
приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,5 мг/кг-10 мг/кг), например, с  
25 использованием однократного введения или нескольких отдельных введений или с использованием непрерывного вливания. Обычно суточная доза может составлять  
приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Повторные введения в течение нескольких дней или более осуществляют в  
зависимости от состояния, при этом лечение, как правило, продолжают до тех пор,  
30 пока не достигается требуемое подавление симптомов заболевания. Типичная доза антитела находится в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих  
приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить с определенной периодичностью, например, каждую  
35 неделю или каждые три недели (например, чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз антитела). Сначала можно вводить более высокую дозу, а затем вводить одну или более доз с  
более низким содержанием антитела. Типичная схема введения доз включает введение начальной высокой дозы антитела, приблизительно 4 мг/кг, с последующим введением  
40 еженедельной поддерживающей дозы антитела, приблизительно 2 мг/кг. Однако можно использовать другие схемы введения препаратов. Эффективность указанного лечения можно легко контролировать с помощью стандартных методов и анализов.

Следует понимать, что любые составы или методы лечения, описанные выше, можно проводить с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо  
45 или дополнительно к анти-HLA-G антителу

## II. Изделия

В другом объекте настоящего изобретения предлагается изделие, содержащее материалы, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики расстройств,

описанных выше. Изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш-инструкцию, вложенную в упаковку или распечатанную на контейнере. Пригодные контейнеры включают, например, бутылочки, флаконы, шприцы, пакеты для растворов для внутривенного вливания и т.д. Контейнеры можно изготовить из множества материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией проявляет эффективность при лечении, профилактике и/или диагностике состояния, а также может быть снабжен зоной доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для раствора для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере, один активный агент в композиции представляет собой антитело по изобретению. На этикетке или вкладыше-инструкции указано, что композицию можно использовать для лечения выбранных состояний. Кроме того, изделие может содержать (а) первый контейнер, включающий композицию, которая содержит антитело по изобретению, и (б) второй контейнер, включающий композицию, которая содержит дополнительный цитотоксический агент или иное лекарственное средство. Изделие в указанном варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вкладыш-инструкцию, в которой указано, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В другом варианте или дополнительно изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWHI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Изделие может также включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения или для удобства пользователя, включая другие буферные растворы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Следующие ниже примеры и фигуры предоставлены для облегчения понимания настоящего изобретения, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что в изложенные процедуры могут быть внесены модификации, не выходящие за пределы сущности настоящего изобретения.

Описание аминокислотных последовательностей

Антитела анти-HLA-G (вариабельные области и гипервариабельные области (HVRs)):

SEQ ID NO: 1 тяжелая цепь HVR-H1, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 2 тяжелая цепь HVR-H2, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 3 тяжелая цепь HVR-H3, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 4 легкая цепь HVR-L1, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 5 легкая цепь HVR-L2, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 6 легкая цепь HVR-L3, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 7 вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 8 вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0031,  
 SEQ ID NO: 9 тяжелая цепь HVR-H1, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 10 тяжелая цепь HVR-H2, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 11 тяжелая цепь HVR-H3, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 12 легкая цепь HVR-L1, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 13 легкая цепь HVR-L2, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 14 легкая цепь HVR-L3, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 15 вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 16 вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0039,  
 SEQ ID NO: 17 тяжелая цепь HVR-H1, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 18 тяжелая цепь HVR-H2, HLA-G-0041,

- SEQ ID NO: 19 тяжелая цепь HVR-H3, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 20 легкая цепь HVR-L1, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 21 легкая цепь HVR-L2, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 22 легкая цепь HVR-L3, HLA-G-0041,  
 5 SEQ ID NO: 23 переменный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 24 переменный домен легкой цепи VL, HLA-G-0041,  
 SEQ ID NO: 25 тяжелая цепь HVR-H1, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 26 тяжелая цепь HVR-H2, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 27 тяжелая цепь HVR-H3, HLA-G-0090,  
 10 SEQ ID NO: 28 легкая цепь HVR-L1, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 29 легкая цепь HVR-L2, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 30 легкая цепь HVR-L3, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 31 переменный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0090,  
 SEQ ID NO: 32 переменный домен легкой цепи VL, HLA-G-0090,  
 15 SEQ ID NO: 33 гуманизированный вариант переменного домена тяжелой цепи VH,  
 HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104),  
 SEQ ID NO: 34 гуманизированный вариант переменного домена легкой цепи VL,  
 HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104).
- Другие последовательности
- 20 SEQ ID NO: 35: типичный HLA-G человека,  
 SEQ ID NO: 36: типичный внеклеточный домен (ECD) HLA-G человека,  
 SEQ ID NO: 37: типичный  $\beta$ 2M человека,  
 SEQ ID NO: 38: модифицированный ECD HLA-G человека (где специфические  
 аминокислоты HLA-G заменены на консенсусные аминокислоты HLA-A (= непривитой  
 25 (degrafted) HLA-G, см. также фиг. 1)),  
 SEQ ID NO: 39: типичный HLA-A2 человека,  
 SEQ ID NO: 40: типичный ECD HLA-A2 человека,  
 SEQ ID NO: 41: типичный ECD H2Kd мыши,  
 SEQ ID NO: 42: типичный ECD RT1A крысы,  
 30 SEQ ID NO: 43: типичный комплекс MHC класса I HLA-G человека и  $\beta$ 2M,  
 SEQ ID NO: 44: типичный модифицированный комплекс MHC класса I HLA-G  
 человека и  $\beta$ 2M (где специфические аминокислоты HLA-G заменены консенсусными  
 аминокислотами HLA-A (= непривитой (degrafted) HLA-G), см. также фиг. 1),  
 SEQ ID NO: 45: типичный комплекс MHC класса I H2Kd мыши и  $\beta$ 2M,  
 35 SEQ ID NO: 46: типичный комплекс MHC класса I HLA-G человека/H2Kd мыши и  
 $\beta$ 2M, где аминокислотные остатки в положениях, специфичных для HLA-G человека,  
 привиты (grafted) на каркасный участок H2Kd мыши,  
 SEQ ID NO: 47: типичный комплекс MHC класса I RT1A крысы и  $\beta$ 2M,  
 SEQ ID NO: 48: типичный комплекс MHC класса I HLA-G человека/RT1A крысы и  
 40  $\beta$ 2M, где аминокислотные остатки в положениях, специфичных для HLA-G человека,  
 привиты (grafted) на каркасный участок RT1A крысы,  
 SEQ ID NO: 49 линкер и his-Tag,  
 SEQ ID NO: 50 пептид,  
 SEQ ID NO: 51 консервативная область легкой цепи каппа антитела человека,  
 45 SEQ ID NO: 52 консервативная область легкой цепи лямбда антитела человека,  
 SEQ ID NO: 53 консервативная область тяжелой цепи антитела человека, полученной  
 из IgG1,  
 SEQ ID NO: 54 консервативная область тяжелой цепи антитела человека, полученной

из IgG1, содержащая мутации L234A, L235A и P329G,

SEQ ID NO: 55 консервативная область тяжелой цепи антитела человека, полученной из IgG4.

5 Аминокислотные последовательности анти-HLA-G антител (вариабельные области подчеркнуты и гипервариабельные области (HVR) выделены жирным шрифтом)

SEQ ID NO: 7: вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0031:

QVKLMQSGAALVKPGTSVKMSCNASGYTFT **DYWVSWVKQSHGKRLEWVGEI**  
**SPNSGASNFDENFKDKATLTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTRSSHGSFR**  
 10 **WFAYWGGQGLVTVSS**

SEQ ID NO: 8: вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0031:

AIVLNQSPSSIVASQGEKVTITC **RASSSVSSNHLHWYQQKPGAFPKFVIYSTSQR**  
 15 **ASGIPSRFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDVATYYCQOGSSNPYTFGAGTKLELK**

SEQ ID NO: 33: гуманизированный вариант вариабельного домена тяжелой цепи VH, HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT **DYWVSWVRQAPGQRLEWMGEI**  
 20 **SPNSGASNFDENFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSHGSFR**  
**WFAYWGGQGLVTVSS**

SEQ ID NO: 34: гуманизированный вариант вариабельного домена легкой цепи VL, HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104):

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC **RASSSVSSNHLHWYQQKPGKAPKFLIYSTSQ**  
**RASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQOGSSNPYTFGQGTKLEIK**

SEQ ID NO: 15: вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0039:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS **SYAMNWVRQAPGKGLEWVSVISG**  
 30 **SGVSTYYADSVKGRFTISRDNRSRNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGSYNYG**  
**YGDYFDYWGGQGLVTVSS**

SEQ ID NO: 16: вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0039

35 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSVLYSSKNKNYLAWYQQKPGQPPKLF**  
**YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQOYYNTPRTFGQG**  
 TKVEIK

SEQ ID NO: 23: вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0041:

40 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST **TYGMSWVRQAPGKGLEWVSVISG**  
**GGVSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNRLRAEDTAVYYCAKDGSYNYG**  
**YGDYFDYWGGQGLVTVSS**

SEQ ID NO: 24: вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0041

45 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQNVLYSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLI**  
**YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQOYYNTPRTFGQG**  
 TKVEIK

SEQ ID NO: 31: вариабельный домен тяжелой цепи VH, HLA-G-0090:

**QVQLQQSGPGLLKPSQTLSTCAISGDSVSSNRAAWN**WIRQSPSRGLEWLGRTY  
**YRSKWYNDYAVSVQGRITLIPDTSKNQFSLRLNSVTPEDTAVYYCASVRAVAP**  
**FDYWGQGVLVTVSS**

SEQ ID NO: 32: вариабельный домен легкой цепи VL, HLA-G-0090

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSVLNSSNNKNNLA**WYQQQPGQPPLLI  
**YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQYYRTPWTFGGG**  
**TKVEIK**

Специфические варианты осуществления настоящего изобретения перечислены ниже:

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с HLA-человека, где антитело включает

A) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 3, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или

B) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 11, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или

C) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 19, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или

D) (a) домен VH, включающий (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 27, и (b) домен VL, включающий (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

2. Антитело по варианту 1, где антитело включает

A)

i) включает последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 8,

ii) или гуманизированный вариант VH и VL антитела по п. i), или

iii) включает последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ

ID NO: 34, или

B)

включает последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 16, или

5 C)

включает последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 24, или

D)

10 включает последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

3. Выделенное антитело, которое связывается с HLA-G человека, где антитело

a) связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, которое включает последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 8,

15 или b) связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело, которое включает последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

4. Анти-HLA-G антитело по любому из вариантов 1-4, где антитело

a) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 44, и/или

20 b) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 37, и/или

c) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO: 45, и/или

e) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO: 47, и/или

25 f) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43), и/или

g) ингибирует связывание ILT2 с тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43) более чем на 50% (в одном варианте более чем на 60%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

30 h) ингибирует связывание ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I (включающим последовательность SEQ ID NO: 43) более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 4b), и/или

35 i) ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без антитела) (см. пример 6), и/или

j) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (см. пример 5) и ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3 (ATCC No. HTB36) (более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%)) (по сравнению со связыванием без

40 антитела) (см. пример 6), и/или

k) ингибирует связывание CD8a с HLAG более чем на 80% (по сравнению со связыванием без антитела) (см., например, пример 4 c), и/или

45 l) восстанавливает HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36).

5. Антитело по любому из предшествующих вариантов, где антитело представляет собой изотип IgG1.

6. Антитело по варианту 5, где антитело представляет собой изотип IgG1 с мутациями

L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU индексу Кабата).

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих вариантов.

8. Клетка хозяина, включающая нуклеиновую кислоту по варианту 7.

5 9. Способ продуцирования антитела, который включает культивирование клеток хозяина по варианту 7 таким образом, чтобы продуцировать антитело.

10. Способ по варианту 9, который дополнительно включает выделение антитела из клетки хозяина.

10 11. Фармацевтический состав, включающий антитело по любому из вариантов 1 - 6 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Антитело по любому из вариантов 1 - 6 для применения в качестве лекарственного средства.

13. Антитело по любому из вариантов 1 - 6 для применения при лечении рака.

15 14. Применение антитела по любому из вариантов 1 - 6 для получения лекарственного средства.

15. Применение по варианту 14, где лекарственное средство предназначено для лечения рака.

16. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму эффективного количества антитела по вариантам 1 - 6.

20 17. Способ выбора анти-HLA-G антител (например, по вариантам 1 - 6), включающий следующие стадии:

а) определение (оценка) уровня связывания анти-HLA-G антител с комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO:43, по данным метода поверхностного плазменного резонанса,

25 б) определение уровня ингибирования связывания ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I соответствующими анти-HLAG антителами, и

30 в) выбор анти-HLA-G антител, которые ингибируют связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) (по сравнению со связыванием без антитела), или выбор анти-HLA-G антител, которые ингибируют связывание ILT2 с мономерным и/или димерным и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I более чем на 50% (в одном варианте более чем на 70%) (по сравнению со связыванием без антитела),

35 д) восстанавливает HLA-G-специфичный пониженный иммунный ответ (например, сниженное высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )) в моноцитах, совместно культивируемых с клетками JEG-3 (ATCC HTB36).

18. Способ выбора анти-HLA-G антител (например, по варианту 6), включающий следующие стадии:

40 а) определение уровня связывания анти-HLA-G антител с клетками JEG3 ((ATCC No. HTB36) методом проточной цитометрии (используя сортировку флуоресцентно-активированных клеток) (анализ FACS),

б) определение уровня ингибирования связывания ILT2 с клетками JEG3 ((ATCC No. HTB36) соответствующими анти-HLA-G антителами методом проточной цитометрии (используя сортировку флуоресцентно-активированных клеток) (анализ FACS), и

45 в) выбор анти-HLA-G антител, которые связываются с клетками JEG3 (ATCC No. HTB36) и ингибируют связывание ILT2 с клетками JEG3 (ATCC No. HTB36) более чем на 50% (в одном варианте более чем на 80%) по сравнению со связыванием без антитела.

Примеры

## Методы рекомбинантных ДНК

Для работы с ДНК использовали стандартные методики, как описано в книге Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Молекулярно-биологические реагенты  
5 использовали согласно инструкциям фирм-изготовителей.

### Синтез генов и олигонуклеотидов

Требуемые сегменты гена получали химическим синтезом на фирме Geneart GmbH (Regensburg, Germany). Синтезированные фрагменты генов клонировали в плазмиды *E. coli* для размножения/амплификации. Последовательности ДНК субклонированных  
10 фрагментов гена подтверждали секвенированием ДНК. В другом варианте короткие фрагменты синтезированных ДНК получали при отжиге полученных химическим синтезом олигонуклеотидов или с использованием ПНР. Соответствующие олигонуклеотиды получали на фирме metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany).

Описание основной/стандартной экспрессионной плазмиды млекопитающих  
15 Для экспрессии требуемого гена/белка (например, полноразмерной тяжелой цепи антитела, полноразмерной легкой цепи антитела или соединения МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса I, например, HLA-G, или соединения МНС класса I, гибридного с пептидом и  $\beta$ -2 микроглобулином, например, HLA-G, гибридного с HLA-G связывающим пептидом и/или  $\beta$ -2 микроглобулином)  
20 использовали единицу транскрипции, содержащую следующие функциональные элементы:

- Немедленно-ранний энхансер и немедленно ранний промотер цитомегаловируса человека (P-CMV), включающие интрон А,
- 5'-нетранслируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина человека (5'UTR),  
25 - сигнальную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина мыши,
- ген/белок для экспрессии (например, полноразмерная тяжелая цепь антитела или соединение МНС класса I), и
- последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH рА).

Кроме единицы/кассеты экспрессии, включающих требуемый ген, предназначенный  
30 для экспрессии, основная/стандартная плазида экспрессии человека включает

- источник репликации из вектора рUC18, который обеспечивает репликацию данной плазмиды в *E. coli*,
- ген бета-лактамазы, который придает *E. coli* устойчивость к ампицилину.

### Определение белка

35 Концентрацию белка очищенных полипептидов определяли по оптической плотности (OD) при 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции, рассчитанного на основе аминокислотной последовательности полипептида.

### Пример 1

Получение гибридных соединений HLA-G для скрининга и контрскрининга  
40 Вследствие высокой гомологичности (>98%) с другими соединениями МНС I иммунизация соединениями HLA-G приводит к получению поликлональной сыворотки, состоящей из перекрестнореактивных антител МНС-I и действительно специфичных антител HLA-G.

К настоящему времени отсутствуют средства выбора действительно специфичных  
45 антител HLA-G без перекрестной реактивности с другими МНС-I (например, HLA-A) и дополнительного выбора антител с функцией блокирования рецептора.

Мы идентифицировали уникальные положения HLA-G в комбинации с положениями, необходимыми для структурного соответствия и взаимодействия с рецептором (ILT2/4

и KIR2DL4.)

Уникальные и близкие положения HLA-G человека затем "прививали" на комплексные соединения МНС класса I от грызунов различных видов (такие как RT1A крысы и H2kd мыши), при этом получали "гибридные" иммуногенные/скрининговые антигены.

5 Полученные антигены подвергали строгому скринингу на связывание/специфичность (и на отсутствие связывания/специфичности в отношении контрантигенов, соответственно).

Скрининг антигенов

10 - рекомбинантный HLA-G, экспрессированный как соединение МНС HLA-G  $\beta$ 2M человека, включающий последовательность SEQ ID NO: 43

- специфичные к HLA-G последовательности, привитые на RT-1 крысы и H2kd мыши (SEQ ID NO: 46: комплекс МНС класса I HLA-G человека/H2Kd  $\beta$ 2M мыши, где положения, специфичные к HLA-G человека, прививают на каркасную область H2Kd мыши, и SEQ ID NO: 48: комплекс МНС класса I HLA-G человека/RT1A  $\beta$ 2M крысы,

15 где положения, специфичные к HLA-G, прививают на каркасную область RT1A крысы)

- Клетки (например, клетки Jeg3), экспрессирующие природный комплекс МНС класса I HLA-G, или трансфектированные клеточные линии HLA-G человека SKOV3 HLA-G+ и PA-TU-8902 HLA-G+

Скрининг контрантигенов

20 - Контрантигены (комплексы МНС класса I) с другими последовательностями HLA-A (HLA-A2 и HLA-G, к которым не привита консенсусная последовательность H1A-A) в комбинации с различными пептидами) (см., например, SEQ ID NO 40 (HLA-A2) и SEQ ID NO: 44 консенсусная последовательность HLA-A на каркасной области HLA-G)

25 - Контрантигены (комплексы МНС класса I) из других видов, такие как RT-1 крысы и H2kd мыши (SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47)

- Немодифицированные клеточные линии опухолевых клеток SKOV3 и PA-TU-8902, которые характеризуются отсутствием экспрессии HLA-G.

Дизайн гибридных антигенов HLA-G для применения при иммунизации и скрининге для получения специфичных к HLA антител (см. фиг. 1):

30 Дизайн гибридного соединения МНС I крысы (RT1-A), несущего уникальные положения HLA-G (SEQ ID NO: 48) для применения при иммунизации трансгенных крыс или кроликов или мышей и т.п. и крыс, кроликов и мышей и т.п. дикого типа (wt) и/или для применения скрининговых исследований.

Уникальные положения HLA-G идентифицировали выравниванием 35 последовательностей 2579 HLA-A, 3283 HLA-B, 2133 HLA-C, 15 HLA-E, 22 HLA-F и 50 HLA-G из IMGT (доступного 6 февраля 2014). Те остатки HLA-G, которые встречаются реже 1% (обычно -0%) среди последовательностей из любого из трех наборов последовательностей HLA-A, HLA-B и объединенного набора последовательностей HLA-C + HLA-E + HLA-F, были названы уникальными последовательностями HLA-G.

40 Четыре основных уникальных положения HLA-G (2 в  $\alpha$ -1 и 2 в  $\alpha$ -3) не проявляют полиморфизм в наборе последовательностей HLA-G и ни один из других генов HLA не содержит специфичные остатки HLA-G в указанных положениях (за исключением 1x HLA-A для M100, 1x HLA-B для Q103 и 1x HLA-C для Q103).

45 Кристаллическую структуру RT1-A крысы (Rudolph M.G. и др., J.Mol.Biol., т. 324, сс. 975-990 (2002), код PDB: 1KJM) совмещали с кристаллической структурой HLA-G человека (Clements C.S. и др., PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, т. 102, сс. 3360-3365 (2005), код PDB: 1YDP). Общая структура  $\alpha$ -цепи и связанного ( $\beta$ -микроглобулина являлась консервативной).

Уникальные положения HLA-G идентифицировали в структуре RT1-A при сравнении последовательности и структурных выравниваниях. На первой стадии идентифицировали уникальные положения HLA-G, расположенные на молекулярной поверхности HLA-G и RT1-A и, таким образом, доступные для антитела. Уникальные положения, которые расположены внутри укладки белка, были исключены для инженерии. На второй стадии идентифицировали структурно соседние остатки, которые также необходимо изменить для получения соответствующей области „HLA-G-like“, т.е. для получения реальных эпитопов HLA-G, скорее содержащие уникальные положения, а не гибридные эпитопы HLA-G/RT1-A крысы, которые являются искусственными. Все положения, которые таким образом были выбраны для мутации, анализировали на структурное соответствие соответствующему остатку из HLA-G для исключения возможных местных нарушений молекулярной структуры после мутации.

Гибридное соединение МНС I мыши (H2Kd), содержащее уникальные положения HLA-G (SEQ ID NO: 46), для применения при иммунизации и/или для применения скрининговых анализов, получали аналогичным образом.

Дизайн контрантигенов на основе HLA-A "в отсутствие прививки" уникальных положений HLA-G в отношении консенсусной последовательности HLA-A для применения в качестве контрантигена при скрининге (SEQ ID NO:44).

Уникальные положения, полученные с помощью множественного выравнивания последовательностей, анализировали в кристаллической структуре HLA-G человека (код PDB: 1YDP). Сначала из инженерии исключали положения, не расположенные на поверхности HLA-G и, таким образом, недоступные для антитела. Затем расположенные на поверхности остатки анализировали на возможность аминокислотного обмена (т.е. исключение возможных локальных нарушений молекулярной структуры при мутации соответствующего положения). Всего пригодными для обмена были признаны 14 положений. Аминокислоты в признанных положениях мутировали в отношении консенсусной последовательности HLA-A, полученной после множественного выравнивания последовательностей 2579 HLA-A, загруженных из IMGt (как было доступно 6 февраля 2014 г.).

Получение экспрессионных плазмид для растворимых классических и неклассических соединений МНС класса I

Рекомбинантные гены МНС класса I кодируют удлиненные с N-конца гибридные соединения, состоящие из пептида, который, как известно, связан с соответствующим соединением МНС класса I,  $\beta$ -2 микроглобулином, и соответствующим соединением МНС класса I.

Экспрессионные плазмиды для временной экспрессии растворимых соединений МНС класса I, кроме экспрессионной кассеты растворимых соединений МНС класса I, содержат источник репликации из вектора pUC18, который обеспечивает репликацию этой плазмиды в *E. coli*, и ген  $\beta$ -лактамазы, который придает *E. coli* резистентность к ампицилину.

Единица транскрипции растворимого соединения МНС класса I включает следующие функциональные элементы:

- немедленно-ранние энхансер и промотер из цитомегаловируса человека (P-CMV), включая интрон A,
- 5'-нетранслированную область тяжелой цепи иммуноглобулина человека (5'UTR),
- сигнальную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина мыши,
- нуклеиновую кислоту, кодирующую укороченную с N-конца сортазу *S. aureus*, и
- последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH pA).

Аминокислотные последовательности зрелых растворимых соединений МНС класса I, полученных из различных источников, включают:

SEQ ID NO: 43: типичный комплекс HLA-G  $\beta$ 2M МНС класса I человека

5 SEQ ID NO: 44: типичный модифицированный комплекс HLA-G  $\beta$ 2M МНС класса I человека (где специфические аминокислоты HLA-G были заменены на консенсусные аминокислоты HLA (= в отсутствие прививки HLA-G, см. также фиг. 1)

SEQ ID NO: 45: типичный комплекс H2Kd  $\beta$ 2M МНС класса I мыши

10 SEQ ID NO: 46: типичный комплекс HLA-G человека/H2Kd  $\beta$ 2M МНС мыши, где положения, специфичные для HLA-G человека, были привиты на каркасную область H2Kd мыши

SEQ ID NO: 47: типичный комплекс RT1A  $\beta$ 2M МНС класса I крысы

SEQ ID NO: 48: типичный комплекс HLA-G человека/RT1A  $\beta$ 2M МНС крысы, где положения, специфичные для HLA-G человека, были привиты на каркасную область RT1A крысы.

15 Для типичного комплекса HLA-A2  $\beta$ 2M МНС класса I, использованного при скрининге, использовали следующие компоненты и комплекс экспрессировали в *E.coli*, а затем очищали.

20 Комплекс МНСI HLA-A2 /  $\beta$ 2M (SEQ ID NOs 40 и 37) (оба с дополнительным N-концевым метионином)+пептид VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 50) + линкер и his-Tag (SEQ ID NO: 49).

Пример 2

Кампания иммунизации

А) Иммунизация мышей и крыс

25 а. Гибридные белки (для резистентности к неспецифичным МНС-I/HLA и направленности к уникальным положениям HLA-G)

30 Для иммунизации использовали мышей Balb/C фирмы Charles River Laboratories International, Inc. Животных размещали согласно Приложению А "Guidelines for accommodation and care of animals" в аккредитованном AAALACi виварии. Все протоколы и эксперименты по иммунизации животных были утверждены правительством Верхней Баварии (номер разрешения 55.2-1-54-2531-19-10 и 55.2-1-54-2532-51-11) и осуществлены согласно акту German Animal Welfare Act и директивы Directive 2010/63 Европейского парламента и суда.

35 Мышей Balb/C (n=5) возрастом 6-8 недель иммунизовали в течение 5 курсов иммунизации с использованием гибридного соединения H2Kd/HLA-G (SEQ ID NO: 46 ("HLA-G-0006")) в течение 4 недель. Перед каждой иммунизацией мышь анестезировали газообразной смесью кислорода и изофлурана. Для первой иммунизации 15 мкг белка растворяли в 20 мМ буферном растворе His/HisCl, 140 мМ Nad, pH 6,0, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда CFA (BD Difco, #263810) и вводили подкожно (s.c.) в 6 участков, соседних с дренирующими лимфоузлами, вдоль спины 40 мыши, при этом в 2 участка на затылке и 2 участка с двух сторон от паха и голени. Другие 15 мкг белка, эмульгированного в адьюванте RIBI (фирмы Sigma-Aldrich, номер по каталогу S6322), вводили в 6 смежных участков брюшной полости, то есть по 2 участка по обе стороны от подмышечной впадины, паха и бедра. Уменьшающиеся дозы бустерной иммунизации вводили в день 7 (10 мкг), 14 (5 мкг), 21 (5 мкг) и 28 (5 45 мкг) аналогичным образом, за исключением того, что во всех случаях использовали адьювант RIBI и дозы вводили только в брюшную полость. Через три дня после конечной иммунизации мышей умерщвляли и в асептических условиях удаляли двусторонние подколенные, поверхностные паховые, подмышечные и бронхиальные

лимфоузлы и готовили для получения гибридомы. Сыворотку тестировали на продуцирование рекомбинантных антител HLA-G человека и иммуноген-специфических общих антител IgG с использованием ИФА после третьей и пятой иммунизации.

Другую группу мышей Balb/C (n=5) возрастом 6-8 недель иммунизировали в течение 5 трех курсов гибридным соединением H2Kd/HLA-G (HLA-G-0006) в течение 3 месяцев. Для первой иммунизации 100 мкг белка, растворенного в 20 мМ буферном растворе His/HisCl, 140 мМ Nad, pH 6,0, смешивали с равным объемом CFA (BD Difco, #263810) и вводили внутривентриально (i.p.). Бустерную иммунизацию проводили в дни 28 и 56 10 аналогичным образом, за исключением того, что использовали неполный адъювант Фрейнда (IFA, BD Difco, #DIFC263910). В период от 4 до 5 недель после конечной иммунизации мышам вводили приблизительно 25 мкг иммуногена внутривенно (i.v.) в 15 стерильном PBS и через 72 ч у мышей в асептических условиях удаляли селезенки и готовили их для получения гибридом. Сыворотку тестировали на рекомбинантный HLA-G человека (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) и иммуноген-специфичную гибридную молекулу H2Kd/HLA-G (SEQ ID NO: 46 ("HLA-G-0006")) и подвергали контрскринингу с "непривитым" HLA-G человека со специфическими положениями консенсусной HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")) и белка H2kd мыши (SEQ ID NO: 45 "HLA-G-0009")) продуцированных общих антител IgG с использованием ИФА после третьей и пятой иммунизации.

20 в. Белок wt (дикого типа) HLA-G

Для иммунизации использовали крыс CD rats фирмы Charles River Laboratories International, Inc. Животных размещали согласно Приложению А "Guidelines for accommodation and care of animals" в аккредитованном AAALACi виварии. Все протоколы и эксперименты по иммунизации животных были утверждены правительством Верхней 25 Баварии (номер разрешения 55.2-1-54-2532-51-11) и осуществлены согласно акту German Animal Welfare Act и директивы Directive 2010/63 Европейского парламента и суда.

Крыс CD (n=4) возрастом 6-8 недель иммунизировали в течение 4 курсов иммунизации рекомбинантным белком HLA-G человека (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) в течение 4 30 месяцев. Для первой иммунизации 100 мкг белка, растворенного в 20 мМ буферном растворе His/HisCl, 140 мМ Nad, pH 6,0, смешивали с равным объемом CFA (BD Difco, #263810) и вводили внутривентриально. Бустерную иммунизацию проводили в дни 28, 56 и 84 аналогичным образом, за исключением того, что использовали неполный адъювант Фрейнда (IFA from BD Difco, #DIFC263910). В период от 3 до 5 недель после 35 конечной иммунизации мышам вводили приблизительно 75 мкг иммуногена внутривенно (i.v.) в стерильном PBS и через 72 ч у мышей в асептических условиях удаляли селезенки и готовили их для получения гибридом. Сыворотку тестировали на продуцирование рекомбинантных антител HLA-G (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), специфичных к IgG1, IgG1a, IgG2b и IgG2c, после третьей и четвертой иммунизации, и подвергали контрскринингу с "непривитой" HLA-G человека со специфическими положениями 40 консенсусной HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")).

в. Клетки JEG3 (ATCC No. HTB36) (экспрессирующие природный HLA-G)

Для иммунизации использовали крыс CD фирмы Charles River Laboratories International, Inc. Животных размещали согласно Приложению А "Guidelines for accommodation and care of animals" в аккредитованном AAALACi виварии. Все протоколы и эксперименты 45 по иммунизации животных были утверждены правительством Верхней Баварии (номер разрешения 55.2-1-54- 2531-83-13) и осуществлены согласно акту German Animal Welfare Act и директивы Directive 2010/63 Европейского парламента и суда.

Две группы крыс CD (n=2) возрастом 6-8 недель иммунизировали с использованием

либо 5 (группа А) либо 7 (группа В) курсов иммунизации клетками JEG-3 (ATCC HTB36) в течение 5 (А) и 7 (В) месяцев, соответственно. Для первой иммунизации  $1 \times 10^7$  клеток, растворенных в стерильном PBS, смешивали с равным объемом стерильного CFA (BD Difco, #263810) и вводили внутривентрально. Бустерные иммунизации проводили в группах А и В в дни 28, 56, 84, 112, 140 (только в группе В) и 168 (только в группе В) аналогичным образом, за исключением того, что использовали неполный адъювант Фрейнда (IFA from BD Difco, #DIFC263910). Через 3 недели после конечной иммунизации крысам вводили 100 мкг рекомбинантного белка HLA-G человека (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) i.v. в стерильном PBS, и через 72 ч у крыс в асептических условиях удаляли селезенки и готовили их для получения гибридом. Сыворотку тестировали на продуцирование рекомбинантных антител HLA-G (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), специфичных к IgG1, IgG1a, IgG2b и IgG2c с использованием ИФА после третьей, пятой и седьмой иммунизации, соответственно, и подвергали контрскринингу с "непривитым" HLA-G человека со специфическими положениями консенсусной HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")).

d. JEG3/DNA IMS (для бустерного эффекта)

Для иммунизации использовали крыс CD rats фирмы Charles River Laboratories International, Inc. Животных размещали согласно Приложению А "Guidelines for accommodation and care of animals" в аккредитованном AAALACi виварии. Все протоколы и эксперименты по иммунизации животных были утверждены правительством Верхней Баварии (номер разрешения 55.2-1-54-2531-83-13) и осуществлены согласно акту German Animal Welfare Act и директивы Directive 2010/63 Европейского парламента и суда.

Крыс CD (n=5) возрастом 6-8 недель иммунизировали плазмидной ДНК и клетками в чередующемся режиме в течение 3 месяцев. Для данной цели использовали плазмидную ДНК HLA-G-0030 (p 17747), кодирующую HLA-G человека в виде одноцепочечной молекулы, и экспрессирующие природный HLA-G клетки JEG-3 (ATCC HTB36), соответственно.

Для первой иммунизации животных анестезировали изофлураном и иммунизировали 100 мкг плазмидной ДНК в стерильной воде чрескожно (i.d.), которую вводили в один участок на выбритой спине, соседний с хвостом животного. После введения i.d. участок электропорировали с использованием следующих параметров и системы для электропорации ECM 830 (VTX Harvard Apparatus): два раза 1000 В/см каждый по 0,1 мс с интервалом 125 мс и затем четыре раза 287,5 В/см в течение 10 мс также с интервалами по 125 мс. Во время второй иммунизации в день 14 животным вводили  $1 \times 10^7$  клеток, растворенных в стерильном PBS, который был смешан с равным объемом CFA (BD Difco, #263810), и которые, после получения стабильной эмульсии вводили внутривентрально. Бустерные иммунизации проводили в дни 28 (ДНК), 42 (клетки), 56 (ДНК), 70 (клетки) аналогичным образом, за исключением того, что для иммунизации клетками использовали неполный адъювант Фрейнда (IFA from BD Difco, #DIFC263910). Через 4 недели после конечной иммунизации крысам вводили 100 мкг растворимого рекомбинантного белка HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) i.v. в стерильном PBS, и через 72 ч селезенки удаляли в асептических условиях и готовили для получения гибридомы. Сыворотку тестировали на растворимый рекомбинантный белок HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), специфичный к продуцированию антител IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG2c, с использованием ИФА после третьей, пятой и шестой иммунизации, соответственно, и подвергали контрскринингу "непривитым" HLA-G человека со специфическими положениями консенсусного HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")).

Во всех схемах иммунизации был индуцирован высокий гуморальный полиреактивный иммунный ответ, распознающий HLA-G и белки, использованные для контрскрининга (например, рекомбинантный "непривитой" белок HLA-G человека, гибридное соединение H2Kd/HLA-G или родственные соединения HLA-A2 человека), по данным анализа в формате ИФА с использованием поликлональных сывороток от иммунизированных животных (данные не показаны).

В) Иммунизация гуманизированных крыс OMNIRAT линии 7

Крысы OmniRat линии 7 предоставлены фирмой Open Monoclonal Technology, Inc. (2747 Ross Road, Palo Alto, CA 94303, США) и были выведены и получены на фирме Charles River Laboratories International, Inc. Животных размещали согласно Приложению А "Guidelines for accommodation and care of animals" в аккредитованном AAALACi виварии. Все протоколы и эксперименты по иммунизации животных были утверждены правительством Верхней Баварии (номера разрешения 55.2-1-54-2532-51-11 и 55.2-1-54-2531-83-13) и осуществлены согласно акту German Animal Welfare Act и директивы Directive 2010/63 Европейского парламента и суда.

Крыс OmniRat линии 7 (n=4) возрастом 6-8 недель иммунизовали в течение 4 недель с использованием рекомбинантного гибридного белка HLA-G (SEQ ID NO: 48 ("HLA-G-0011")) в течение 4 месяцев. Для первой иммунизации 100 мкг белка, растворенного в 20 мМ буферном растворе His/HisCl, 140 мМ NaCl, pH 6,0, смешивали с равным объемом CFA (BD Difco, #263810) и вводили внутрибрюшинно. Бустерные иммунизации проводили в дни 28, 56 и 84 аналогичным образом, за исключением того, что во всех случаях использовали неполный адьювант Фрейнда (IFA, BD Difco, #DIFC263910). Через период 3-4 недели после бустерной иммунизации крысам вводили приблизительно 50 мкг иммуногена i.v. и 25 мкг иммуногена i.p. в стерильном PBS и через 72 ч селезенки извлекали в стерильных условиях и готовили для получения гибридом. Сыворотку тетстировали на рекомбинантный белок HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 48 ("HLA-G-0011")), специфичный к продуцированию антител IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG2c, с использованием ИФА после третьей и четвертой иммунизации, соответственно, и подвергали контрскринингу "непривитым" HLA-G человека со специфичными положениями консенсусного HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")).

В другом варианте крыс OmniRat линии 7 (n=5) возрастом 6-8 недель иммунизировали плазмидной ДНК и клетками в чередующемся режиме в течение 3 месяцев. Для данной цели использовали плазмидную ДНК, кодирующую HLA-G в виде одноцепочечной молекулы (белок HLA-G МНС класса I (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), а также, экспрессирующие природный HLA-G клетки JEG-3 (ATCC HTB36), соответственно.

Для первой иммунизации животных анестезировали изофлураном и чрескожно иммунизовали (i.d.) 100 мкг плазмидной ДНК в стерильной воде, вводимых в один участок на выбритой спине, близкий к хвосту животного. После введения i.d. участок электропорировали с использованием следующих параметров на системе для электропорации ECM 830 (фирмы ВТХ Harvard Apparatus): два раза 1000 В/см каждый по 0,1 мс с интервалом 125 мс, а затем 4 раза 287,5 В/см в течение 10 мс также с интервалами по 125 мс. Во время второй иммунизации в день 14 животным вводили  $1 \times 10^7$  клеток, растворенных в стерильном PBS, который был смешан с равным объемом CFA (BD Difco, #263810), и которые, после получения стабильной эмульсии вводили внутрибрюшинно. Бустерные иммунизации проводили в дни 28 (ДНК), 42 (клетки), 56 (ДНК), 70 (клетки) аналогичным образом, за исключением того, что для иммунизации клетками использовали неполный адьювант Фрейнда (IFA, BD Difco, #DIFC263910). Через 4 недели после конечной иммунизации крысам вводили 100 мкг растворимого

рекомбинантного белка HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) i.v. в стерильном PBS, и через 72 ч селезенки удаляли в стерильных условиях и готовили для получения гибридом. Сыворотку тетстировали на растворимый рекомбинантный белок HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), специфичный к продуцированию антител IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG2c, с использованием ИФА после третьей, пятой и шестой иммунизации, соответственно, и подвергали контрскринингу "непривитым" HLA-G человека со специфичными положениями консенсусного HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")).

Во всех схемах иммунизации был индуцирован высокий гуморальный полиреактивный иммунный ответ, распознающий HLA-G и белки, использованные для контрскрининга (например, рекомбинантный "непривитой" белок HLA-G человека, гибридное соединение H2Kd/HLA-G или родственные соединения HLA-A2 человека), по данным анализа в формате ИФА с использованием поликлональных сывороток от иммунизированных животных (данные не показаны).

Полученные антитела

С использованием описанных выше методов были получены следующие антитела, специфически связывающиеся с анти-HLA-G человека: HLA-G 0031 крысы от крыс CD, HLAG 0039 человека, HLA-G 0041 и HLA-G 0090 от гуманизированных крыс.

Связывающие свойства полученных специфичных анти-HLA-G антител и биологические активности определяли, как описано в соответствующих примерах, и сравнивали с известными эталонными антителами. Антитело HLA-G-0031 гуманизировали с использованием его домена HVR и каркасного акцепторного участка VH человека HUMAN\_IGHV1-3 и каркасных акцепторных участков VL человека HUMAN\_IGKV1-17 (V-домен, с одной дополнительной обратной мутацией в положении R46F, нумерация по Кабату).

Для идентификации пригодного каркасного акцепторного участка человека в процессе гуманизации HLAG-0031, связывающегося с HLAG, использовали комбинацию двух методологий. С одной стороны использовали классический подход поиска каркасного акцепторного участка с высокой гомологией последовательностей с исходным антителом и последующей прививки *in silico* областей CDR на указанный каркасный акцепторный участок. Каждое различие в аминокислотах в составе идентифицированного каркасного участка от исходного антитела оценивали по влиянию на структурную целостность связующего соединения и при необходимости учитывали обратные мутации по отношению к исходной последовательности.

С другой стороны, для предсказания ориентации доменов VH и VL гуманизированных версий по отношению друг к другу использовали компьютерное моделирование *in silico*, описанное в заявке WO 2016/062734. Его осуществляли для виртуальной прививки CDR на все возможные комбинации зародышевой линии человека. Результаты сравнивали с ориентацией доменов VH VL исходного связующего соединения для выбора каркасных комбинаций, близких по геометрии к исходному антителу.

Антитела anti-HLAG (SEQ ID NO переменных областей и гипервариабельных областей (HVR)):

анти-HLAG антитело	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3	VH	VL
HLA-G-0031	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
HLA-G-0031-0104 (гуманизир. вариант HLA-G-0031) (HLA-G-0104)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
HLA-G-0039	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16

анти-HLAG антитело	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3	VH	VL
HLA-G-0041	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
HLA-G-0090	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32

### Пример 3

А) Связывание анти-HLA-G антител с растворимым HLA-G человека, растворимым непривитым HLA-G человека со специфичной последовательностью HLA-A, HLA-A2 человека и H2-Kd крысы/мыши

Антитела, полученные после иммунизации, подвергали скринингу по их способности связываться с HLA-G человека, гибридным непривитым HLA-G, HLA-A2 и H2-Kd крысы/мыши. Соответствующие исследования описаны ниже. Для тестирования HLA-G человека использовали как мономерную, так и димерную и тримерную формы (получение см. ниже).

#### Димеризация/тримеризация белка HLA-G МНС класса I

Супернатант, включающий мономерный растворимый белок HLA-G МНС человека класса I (SEQ ID NO: 23) с меткой His-tag наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare #17-5248-02), заполненную 5 мл Ni-Sepharose, со скоростью потока 0,2 мл/мин в течение ночи при комнатной температуре с использованием системы АКТА-FPLC. Колонку промывали 2% DPBS, содержащим 0,5 М имидазол (Merck #8.14223.025), до достижения базовой линии. Затем колонку уравнивали 10 мМ DTT в 2% DPBS, содержащем 0,5 М имидазол, и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для удаления DTT колонку промывали смесью PBS/10 мМ имидазол и белок элюировали в градиенте 2 - 100% DPBS, содержащем 0,5 мМ имидазол. После концентрирования элюата с использованием ячейки для ультрафильтрации Amicon-Ultra 15 М /Ultracel 10К, белок инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре с последующим инкубацией в течение 48 ч при 4°C для проведения димеризации/мультимеризации. Затем проводили разделение димеров и тримеров с использованием хроматографии SEC на колонке Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare #17-5175-01) и промывали 0,5 М NaOH в течение ночи. Колонку уравнивали PBS с последующим насыщением раствором 10 мг/мл BSA. Димеры (фракция А9) и тримеры (фракция А8) собирали, разделяли на

аликвотные части и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до последующего использования.

#### Связывание с wt HLA-G человека по данным ИФА

На планшеты, покрытые стрептавидином (Nunc, MicroCoat #11974998001), наносили биотинилированный wt HLA-G человека при концентрации 250 нг/мл по 25 мкл/в лунке и инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл образцов анти-HLA-G (разбавление 1:3 в буферном растворе OSEP) или эталонных антител (G233, Thermo/Pierce #MA1-19449, 500 нг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка козьих антимышиных антител H+L-POD (Biorad #170-6561, 1:2000 в OSEP) или обезьяньих антикроличьих антител IgG POD (GE #NA9340V, 1:5000 в OSE) и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. Для детектирования IgG крысы добавляли смесь козьих антикрысиных антител IgG1-POD (Bethyl #A110-106P), козьих антикрысиных антител IgG2a-POD (Bethyl #A110-109P) и козьих антикрысиных антител IgG2b-POD (Bethyl #A110-111P) 1:10000 в OSEP и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. После промывки ( $6 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001) и инкубировали до величины поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

Связывание с непривитым HLA-G человека со специфичными последовательностями HLA-A по данным ИФА

На планшеты, покрытые стрептавидином (Nunc, MicroCoat #11974998001), наносили биотинилированный непривитой HLA-G человека при концентрации 250 нг/мл по 25 мкл в лунке и инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл образцов анти-HLA-G (разбавление 1:3 в буферном растворе OSEP) или сыворотку крысы (разбавление 1:600 в OSEP) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли смесь козьих антикрысиных антител IgG1-POD (Bethyl #A110-106P), козьих антикрысиных антител IgG2a-POD (Bethyl #A110-109P) и козьих антикрысиных антител IgG2b-POD (Bethyl #A110-111P) в разбавлении 1:10000 в OSEP по 25 мкл в лунке и инкубировали в течение 1 ч на качалке при КТ. После промывки ( $6 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001) и инкубировали до величины поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

#### Связывание с МНС I крысы (RT1-A) по данным ИФА

На планшеты, покрытые стрептавидином (Nunc, MicroCoat #11974998001), наносили биотинилированный МНС I (RT1-A) крысы при концентрации 250 нг/мл по 25 мкл в лунке и инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл образцов анти-HLA-G (разбавление 1:3 в буферном растворе OSEP) или сыворотку крысы (разбавление 1:600 в OSEP) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки ( $3 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли смесь козьих антикрысиных антител IgG1-POD (Bethyl #A110-106P), козьих антикрысиных антител IgG2a-POD (Bethyl #A110-109P), козьих антикрысиных антител IgG2b-POD (Bethyl #A110-111P) в разбавлении 1:10000 в OSEP и инкубировали в течение 1 ч на качалке при КТ. После промывки ( $6 \times 90$  мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001) и инкубировали до величины поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

#### Связывание с HLA-A2 по данным ИФА

На планшеты, покрытые стрептавидином (Nunc, MicroCoat #11974998001), наносили биотинилированный HLA-A2 человека по 25 мкл в лунке при концентрации 250 нг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл образцов анти-HLA-G (разбавление 1:3 в буферном растворе OSEP) или сыворотку крысы (разбавление 1:600 в OSEP) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) в количестве 25 мкл/лунка добавляли смесь козьих антикрысиных антител IgG1-POD (Bethyl #A110-106P), козьих антикрысиных антител IgG2a-POD (Bethyl #A110-109P), козьих антикрысиных антител IgG2b-POD (Bethyl #A110-111P) в разбавлении 1:10000 в OSEP по 25 мкл в лунке и инкубировали в течение 1 ч на качалке при КТ. После промывки (6×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата TMB (Roche, 11835033001) и инкубировали до величины поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

#### Кинетика связывания анти-HLA-G антител

Кинетику связывания анти-HLA-G антител с HLA-G человека, с непривитым HLA-G человека и HLA-A2 человека исследовали методом поверхностного плазменного резонанса на приборе BIACORE T200 (GE Healthcare). Все эксперименты проводили при 25°C с использованием буферного раствора PBS (pH 7,4+0,05% Tween20) в качестве рабочего буферного раствора и буферного раствора PBS (+0,1% BSA) в качестве буферного раствора для разбавления. Антитела к Fc человека (JIR009-005-098, Jackson) или антитела к Fc крысы (JIR112-005-071, Jackson) или антитела к Fc мыши (JIR115-005-071, Jackson) иммобилизовали на сенсорном чипе Series S CM5 (фирмы GE Healthcare) при pH 5,0 с использованием набора для иммобилизации по аминокислотной группе фирмы GE Healthcare. Анти-HLA-G антитела удерживались на поверхности, что приводило к отклику на удерживание на уровне 50 - 200 RU. На поверхность вводили Соединения HLA-G в течение 180 с со скоростью 30 мкл/мин при концентрациях от 2,5 до 800 нМ (серийные разбавления 2×1:2 и 4×1:3) (фаза ассоциации). Фазу диссоциации наблюдали в течение 300-600 с при промывке рабочим буферным раствором. Поверхность регенерировали при добавлении H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,85%) в течение 60+30 с для антител, удерживающих Fc человека, глицина, pH 1,5, в течение 60 с, и глицина, pH 2,0 в течение 60 с для антител удерживающих Fc крысы, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,85%) в течение 80+60 с для антител, удерживающих Fc мыши. Отличия показателей преломления в объеме корректировали при вычитании отклика, полученного от имитационной поверхности. Контрольные введения вычитали (двойное сравнение). Полученные кривые аппроксимировали с использованием модели связывания Лэнгмюра 1:1 и программного обеспечения VIAevaluation.

#### Эпитоп-перекрестный конкурентный анализ анти-HLA-G антител

Эксперименты по эпитоп-перекрестному конкурентному связыванию анти-HLA-G антител с HLA-G человека исследовали методом поверхностного плазменного резонанса с использованием прибора BIACORE T200 или B4000 (GE Healthcare). Все эксперименты проводили при 25°C с использованием буферного раствора PBS (pH 7,4+0,05% Tween20) в качестве рабочего буферного раствора.

Антитела к Fab человека (GE-Healthcare, 28-9583-25) иммобилизовали на сенсорном чипе Series S CM5 (GE Healthcare) согласно протоколу фирмы-производителя для удерживания антител крыс ОМТ, содержащих домен Ск человека. Анти-HLA-G антитела удерживали в течение 70 с при концентрации 15 мкг/мл. Wt HLA-G вводили (30 мкл/мин) при концентрации 500 или 1000 нМ в течение 60 с. Wt антитела крысы вводили в течение 90 с при концентрации 30 мкг/мл. Фазу диссоциации наблюдали в течение 60

или 240 с при промывке рабочим буферным раствором. Поверхность регенерировали при добавлении глицина, рН 1,5, в течение 60 с и при дополнительном периоде стабилизации в течение 90 с.

В другом варианте анализа антитела к Fab человека (GE-Healthcare, 28-9583-25) иммобилизовали на сенсорном чипе Series S CM5 (GE Healthcare) согласно протоколу фирмы изготовителя для удерживания антител крыс ОМТ, содержащих домен Ск человека. Анти-НLA-G антитела удерживали в течение 90 с при концентрации 30 мкг/мл. Незанятые участки связывания на удерживаемых антителах блокировали при введении в течение 4 × 120 с IgG человека (JIR009-000-003) при концентрации 500 мкг/мл и скорости потока 30 мкл/мин. Wt HLA-G вводили (30 мкл/мин) при концентрации 500 нМ в течение 90 с. Второе антитело крыс ОМТ (домен Ск человека) вводили в течение 90 с при концентрации 30 мкг/мл. Фазу диссоциации наблюдали в течение 240 с при промывке рабочим буферным раствором. Поверхность регенерировали при введении глицина, рН 1,5, в течение 60 с и при дополнительном периоде стабилизации в течении 90 с.

Таблица

Связывание анти-НLA-G антител с рекомбинантным растворимым комплексом НLA-G МНС класса I в его мономерной, димерной и тримерной формах (ИФА)

Антитело	Мономер НLA-G EC50 [нМ]	Димер НLA-G EC50 [нМ]	Тример НLA-G EC50 [нМ]
HLA-G-0031	7,19	1,87	1,86
HLA-G-0039	7,35	4,10	5,29
HLA-G-0041	4,95	5,31	4,87
HLA-G-0090	н/о	н/о	н/о

н/о - не определяли

В приведенной выше таблице представлено связывание различных моноклональных крысиных анти-НLA-G антител человека, полученных из белка wt IMS. Представлены относительные величины EC50 [нг/мл] соответствующего связывания с рекомбинантными мономерными, димерными и тримерными белками wt НLA-G по данным ИФА. ИФА проводили при нанесении биотинилированного антигена wt НLA-G на планшеты, покрытые стрептавидином. После стадий инкубации и промывки соответствующие антитела связывались в концентрационном интервале от 10 до 0 мкг в формате двухкратных разведений. Детектировали связанных антител проводили с использованием конъюгатов anti-Fc-антитело-РОD. Величины EC50 определяли по полученным кривым связывания при концентрациях антитела, генерирующих половину максимального сигнала. В случае небитинилированных димерного и тримерного антигенов НLA-G иммобилизацию осуществляли при случайном нанесении покрытия на планшеты для анализа.

Связывание с НLA-G wt по сравнению с непривитым НLA-G по данным ИФА

Антитело	wt НLA-G (SEQ ID NO:43) (мономер)		Консенсусный НLA-A на непривитом НLA-G (SEQ ID NO:44)	
	EC50 отн. [нг/мл]	Макс. OD	EC50 отн. [нг/мл]	Макс. OD
HLA-G-0031	7,19	1,6	-	0,13
HLA-G-0039	7,35	1,4	-	0,13
HLA-G-0041	8,60	2,3	-	0,15
HLA-G-0090	10,37	3,4	-	0,2

В приведенной выше таблице представлено связывание различных крысиных моноклональных анти-НLA-G антител человека, полученных из wt белка IMS как от

крыс wt, так и крыс ОМТ. Представлены относительные величины EC50 [нг/мл] и максимальные OD соответствующего связывания с рекомбинантным мономерным белком wt HLA-G или с так называемым непривитым белком HLA-G (консенсусная последовательность HLA-A на цепи HLA-G) по данным ИФА. ИФА проводили при нанесении биотинилированного антигена wt HLA-G или консенсусного антигена на планшеты, покрытые стрептавидином. После стадий инкубации и промывки соответствующие антитела связывались в концентрационном интервале от 10 до 0 мкг в формате двукратных разведений. Определение связанных антител проводили с использованием конъюгатов anti-Fc-антитело-POD. Величины EC50 определяли по полученным кривым связывания при концентрациях антитела, генерирующих половину максимального сигнала.

Связывание HLA-G wt по сравнению с непривитым HLA-G -поверхностный плазменный резонанс

Связывающие аффинности антител HLA-G с рекомбинантным HLA-G (SEQ ID NO: 43) и контрольным модифицированным комплексом HLA-G β2M МНС человека класса I (где специфические аминокислоты HLA-G были заменены на консенсусные аминокислоты HLA-A (=непривитой HLA-G SEQ ID NO: 44:)) ("-" означает отсутствие детектируемого связывания)

Антитело	wt HLA-G (SEQ ID NO:25) (мономер)				Консенсусный HLA-A на непривитом HLA-G (SEQ ID NO:26)			
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	t 1/2 (мин)	KD (М)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	t 1/2 (мин)	KD (М)
HLA-G-0031	4,9E+04	3,7E-03	3	7,5E-08	-	-	-	-
HLA-G-0031-0104 (гуманизованный)	8,3E+04	2,0E-03	6	2,4E-08				
HLA-G-0039	4,6E+05	4,4E-04	27	9,5E-10	-	-	-	-
HLA-G-0041	3,8E+05	4,9E-04	23	1,3E-09	-	-	-	-
HLA-G-0090	2,3E+05	8,5E-04	14	3,6E-09	-	-	-	-

В приведенной выше таблице представлены аффинности антител и величины t1/2 по сравнению с wt и непривитым HLA-G по данным поверхностного плазменного резонанса (Biacore). Кинетику связывания анти-HLA-G антител с HLA-G человека и с непривитым HLA-G человека исследовали методом поверхностного плазменного резонанса на приборе BIACORE T200 (GE Healthcare). Все эксперименты проводили при 25°C с использованием буферного раствора PBS (pH 7,4+0,05% Tween20) в качестве рабочего буферного раствора и буферного раствора PBS (+0,1% BSA) в качестве раствора для разбавления. Антитела к Fc человека (JIR009-005-098, Jackson) или Fc крысы (JIR112-005-071, Jackson) или Fc мыши (JIR115-005-071, Jackson) иммобилизовали на сенсорном чипе Series S CM5 (GE Healthcare) при pH 5,0 с использованием набора связывания по аминокислотной группе фирмы GE Healthcare. Анти-HLA-G антитела удерживались на поверхности, что приводило к отклику на удерживание 50 - 200 RU. Небиотинилированные соединения HLA-G наносили в течение 180 с со скоростью 30 мкл/мин при концентрации от 2,5 до 800 нМ (серийные разбавления 2×1:2 и 4×1:3) на поверхность (фаза ассоциации). Фазу диссоциации наблюдали в течение 300-600 с при промывке рабочим буферным раствором.

Поверхность регенерировали при введении H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,85%) в течение 60+30 с для удерживающих Fc человека антител, глицина pH 1,5 в течение 60 с и глицина pH 2,0 в

течение 60 с для удерживающих Fc крысы антител, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,85%) в течение 80+60 с для удерживающих антител Fc мыши. Различия показателей преломления в объеме корректировали при вычитании отклика, полученного с имитационной поверхности. Контрольные введения вычитали (двойное сравнение). Полученные кривые аппроксимировали с использованием модели связывания Лэнгмюра 1:1 и программного обеспечения VIAevaluation (- в приведенной выше таблице означает, что связывание не детектируется).

В следующих экспериментах следующие эталонные антитела (полученные из разных коммерческих источников) сравнивали по связыванию с мономерным HLA-G МНС I человека (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")) и с "непривитым" HLA-G человека с консенсусными специфичными положениями HLA-A (SEQ ID NO: 44 ("HLA-G-0007")): MEM/G9, 87G, G233, 2A12, 4H84, 5A6G7, 6D463, 9-1F10, MEM-G/1, MEM-G/11, MEM-G/2 и MEM-G/4 ("-" означает отсутствие детектируемого связывания).

Антиген	Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	t 1/2 (мин)	KD (М)
wt HLA-G (SEQ ID NO:43) (мономер)	MEM/G9	1,5E+05	1,1E-03	10	7,7E-09
	87G	-	-	-	-
	G233	1,8E+05	3,7E-03	3	2,0E-08
	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	7,4E+04	8,5E-04	14	1,2E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
MEM-G/4	-	-	-	-	

Антиген	Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	t 1/2 (мин)	KD (М)
Консенсусный HLA-A на непривитом HLA-G (SEQ ID NO:44)	MEM/G9	1,2E+05	3,6E-02	0.3	3,0E-07
	87G	-	-	-	-
	G233	-	-	-	-
	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-

Антиген	Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	t 1/2 (мин)	KD (М)
	MEM-G/11	8,9E+04	1,2E-03	10	1,3E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

Следует отметить, что большинство исследованных антител не проявляет никакого специфического связывания с мономерным HLA-G МНС I человека (SEQ ID NO: 43 ("HLA-G-0003")), включая также антитело 87G. Связывание с олигомерными формами HLA-G, как описано в литературе, может быть обусловлено авидностью из-за увеличения участков связывания олигомерных форм.

Только для антитела MEM/G9, величина связывающей аффинности которого составляет KD 7,7E<sup>-09</sup> М, антитела G233, величина связывающей аффинности которого составляет KD 2,0E<sup>-08</sup> М, и MEM-G/11, величина связывающей аффинности которого

составляет 1,2Е М, наблюдалось связывание с мономерным комплексом wt HLA-G МНС I человека. Однако, одно из этих антител, MEM-G/11, также характеризуется некоторым связыванием/кроссреактивностью с консенсусным HLA-A на непривитом HLA-G (SEQ ID NO:44). Кроме того, другое антитело (MEM/G9) также характеризуется

5 сильным неспецифичным связыванием с консенсусным HLA-A на непривитом HLA-G t (SEQ ID NO:44).

#### Пример 4

а) Ингибирование связывания с рецептором (мономерным, ди- и тримерным HLA-G): ИФА. блокировка ИЛТ-2 и ИЛТ-4

10 На планшеты, покрытые стрептавидином (Nunc, MicroCoat #11974998001), наносили биотинилированный wt HLA-G человека при концентрации 500-1000 нг/мл по 25 мкл в лунке и инкубировали при 4°C в течение ночи. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл образцов анти-HLA-G при

15 уменьшающихся концентрациях? начиная от 10 или 3 мкг/мл, затем готовили серийные разбавления 1:3 или 1:2 и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) в количестве 25 мкл/лунка добавляли с-мус-меченный рекомбинантный рецептор ИЛТ-2 при концентрации 200 нг/мл и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) в количестве 25 мкл/лунка добавляли козы антитела anti-c-мус-POD (Bethyl #A190-104P

20 1:7000 in PBST+0.5% BSA) или anti-FcγPOD человека (JIR, 109-036-098, 1:8000 в PBST+0,5% BSA) и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) в количестве 25 мкл/лунка добавляли субстрат ТМВ (Roche, 11835033001) и инкубировали до поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

Кандидатный антиген	Ингибирование ИЛТ2, % (3 мкг/мл антитела)	Ингибирование ИЛТ4, % (3 мкг/мл антитела)
HLA-G-0031	72,8	39,8
HLA-G-0039	14,0	23,9
30 HLA-G-0041	17,4	18,4
HLA-G-0090	100	Не исследовали

В приведенной выше таблице представлен уровень блокировки ИЛТ-2 и ИЛТ-4 различными антителами, связанными с HLA-G при концентрации 3 мкг/мл, по сравнению с взаимодействием HLA-G/рецептор, которое не было заблокировано. HLA-G-0090 исследовали в отдельном эксперименте блокировки ИЛТ2, при этом блокировку ИЛТ4 не оценивали.

б) Биохимическое сравнение анти-HLA-G антител в отношении их ингибирующих свойств связывания ИЛТ2 и ИЛТ4 различными методами анализа

40 ИФА проводили при нанесении Fc-меченных ИЛТ2 и ИЛТ4, соответственно, на микротитрационные планшеты Maxisorp. После стадий инкубации и промывки добавляли соответствующие антитела при концентрации 100 нМ. В лунки добавляли растворимые мономерный, димерный или тримерный HLA-G с меткой His-tag. После стадий инкубации

45 и промывки осуществляли детектирование связанного рецептора с использованием конъюгатов anti-His-антитело-POD. Ингибирование в процентах (%) рассчитывали в сравнении с величинами, полученными из лунок ИЛТ2/4+HLA-G (мономер, димер или тример), не содержащих анти-HLA-G антител или ИЛТ2/4 (связывание 100% = ингибирование 0%).

Антитело	Ингибирование связывания с ILT2, %			Ингибирование связывания с ILT4, %		
	Мономер	Димер	Тример	Мономер	Димер	Тример
HLAG-0031	101	99	100	17	54	68
HLAG-0039	-450	25	70	-224	-105	-43

Антитело	Ингибирование связывания с ILT2, %			Ингибирование связывания с ILT4, %		
	Мономер	Димер	Тример	Мономер	Димер	Тример
HLAG-0041	-437	23	67	-184	-113	-39
HLAG-0090*	92	100	99	31	31	47
MEM-G/9	-442	1	4	-14	-44	-40
87G	-49	19	29	13	18	14
G233	12	-132	3	-898	-20	58
anti-ILT2/ILT4	113	100	101	44	60	60

В представленных выше таблицах указана блокировка взаимодействия между рекомбинантными белками HLA-G (мономер и олигомеры) и их рецепторами ILT2 и ILT4 описанными антителами HLAG при концентрации 110 нМ (\*HLAG-0090 исследовали при концентрации 44 нМ) по данным ИФА. Показано 100% ингибирование взаимодействия HLA-G/рецептор (для ILT2 и ILT4). Менее выраженное ингибирование ILT4 в основном зависит от основного В2М-зависимого взаимодействия этого рецептора.

Гистограммы на фиг. 4а и 4б свидетельствуют об ингибировании в процентах, которое проявляют описанные анти-HLA-G антитела, по сравнению с коммерческими антителами. Коммерческие антитела HLA-G 87G, MEM/G09 и G233 не блокируют взаимодействие HLA-G/ILT2 или ILT4 с такой же эффективностью, как описанные антитела. Кроме того, коммерческие антитела приводят к повышенному связыванию HLA-G с ILT2 или ILT4, в некоторых случаях после связывания.

с) Ингибирование связывания CD8a с HLAG антителами anti-HLAG 384-луночные планшеты, покрытые стрептавидином, блокировали при добавлении блокирующего раствора в количестве 30 мкл/лунка. Блокирующий раствор получали разбавлением 5% поливинилового спирта (PVA, Sigma #P8136) и 8% поливинилпирролидона (PVP, Sigma #PVP360) 1:10 в растворе Starting Block T20 (Thermo Scientific #37543) при добавлении 3,5 мл PVA+3,5 мл и PVP в 35 мл раствора Starting Block T20. 30 мкл биотинилированного HLAG (3 мкг/мл), разбавленного в блокирующем растворе, добавляли в каждую лунку и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. Лунки промывали 3 раза 100 мкл буферного раствора PBS (PAN Biotech # P04-36500), содержащего 0,1% Tween-20 (Merck #8.22184.500). Затем лунки инкубировали с 30 мкл антител anti-HLAG, разбавленных в блокирующем буферном растворе, в трех повторях в течение 1 ч при КТ на качалке, и затем 3 раза промывали 100 мкл буферного раствора PBS, содержащего 0,1% Tween-20. Рекомбинантный CD8a (Sino Biological #10980-H08H, восстановленный при хранении в течение 1 недели при 4°C) разбавляли в блокирующем растворе (1,25 мкг/мл), и во все лунки добавляли по 30 мкл, затем инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на качалке. Лунки промывали 3 раза по 100 мкл PBS, содержащего 0,1% Tween-20. HRP-конъюгированное поликлональное антитело anti-CD8a IgG крысы (USBiological #033547-HRP) разбавляли в 3% бычьим сывороточном альбумине, фракция V (Roche #10735086001)/PBS 0,2% Tween20, и в каждую лунку добавляли по 30 мкл полученного раствора. Затем планшет инкубировали в течение 1 ч при КТ на качалке и промывали 3 раза по 100 мкл PBS, содержащего 0,1% Tween-20. Затем в каждую лунку добавляли по 30 мкл субстрата ТМВ (BM-Blue, растворимый субстрат HRP, Roche #11484281001) с последующей инкубацией в течение 25 мин при КТ на качалке. Затем реакцию останавливали при добавлении в каждую лунку 25 мкл

серной кислоты и измеряли поглощение при 450 нм в ридере для планшетов. Специфическое связывание CD8a с HLAG рассчитывали при вычитании средних величин фона из средних величин связывания. Общее связывание CD8 с HLAG в отсутствие антител рассматривали как 100% связывание или 0% ингибирование.

5 На гистограммах на фиг. 4 с представлено ингибирование в процентах, которое достигается описанными антителами к HLA-G, по сравнению с коммерческими антителами. Коммерческие антитела HLA-G 87G не блокируют взаимодействие HLA-G/CD8a, в то время как MEM/G09 и G233 частично ингибируют взаимодействие HLAG с CD8a по сравнению с описанными антителами в данном формате анализа.

#### 10 Пример 5

Связывание анти-HLA-G антител с клетками

а) Связывание HLA-G с поверхностью клеток по данным ИФА Клетки JEG3 (экспрессирующие природный HLA-G, 20000 клеток/лунка), клетки Skov-3 или клетки Skov-3, экспрессирующие рекомбинантный HLA-G на поверхности клеток (оба типа  
15 клеток по 10000 клеток/лунка) в количестве 25 мкл/лунка высевали в 384-луночные планшеты, обработанные культурой ткани (Corning, 3701), и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день добавляли 12,5 мкл образцов анти-HLA-G (конечное разбавление 1:3) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C. Клетки фиксировали при добавлении 50 мкл/лунка глутарового альдегида до конечной концентрации 0,05%  
20 (Sigma Cat.No: G5882; Lot No.: 056K5318). После промывки (3×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка козьих антител к H+L-POD мыши (Biorad #170-6561 1:2000 в OSEP) или антител обезьяны к IgG POD кролика (GE #NA9340V, 1:5000 в OSE) и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. Для детектирования IgG крысы, смесь козьих антител к IgG1-POD крысы (Bethyl #A110-106P), козьих антител к  
25 IgG2a-POD крысы (Bethyl #A110-109P) и козьих антител к IgG2b-POD крысы (Bethyl #A110-111P) добавляли в разбавлении 1:10000 в OSEP и инкубировали при КТ в течение 1 ч на качалке. После промывки (4×90 мкл/лунка буферным раствором PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001) и инкубировали до поглощения OD 2-3. Измерения проводили на приборе Tecan Safire 2 при длине волны 370/492 нм.

Антитело	Jeg3	wt Skov3	HLA-G <sup>+</sup> Skov3	wt PA-TU- 8902	HLA-G <sup>+</sup> PA- TU-8902
HLA-G- 0031	+++	-	+++	-	+++
HLA-G- 0039	+++	+	+++	-	+++
HLA-G- 0041	+++	++	+++	-	+++
HLA-G- 0090	+++	-	+++	-	+++

В приведенной выше таблице указано связывание различных моноклональных антител крысы анти-HLA-G к HLA-G человека, экспрессируемым на различных клетках, и клеточных линиях, по данным анализа FACS. Описано либо связывание с природным HLA-G, экспрессируемым опухолевыми клетками JEG3 или Skov3 или  
45 трансфектированными клетками PA-TU-8902 и соответствующими родительскими нетрансфектированными клетками.

б) Связывание анти-HLA-G антител с природным или рекомбинантным HLA-G, экспрессируемым на поверхности клеток (по данным анализа FACS)

Для анализа методом проточной цитометрии клетки окрашивали моноклональным анти-**HLA-G** антителом mAb при 4°C. Краткое описание анализа: по 25 мкл/лунка каждой клеточной суспензии ( $5 \times 10^4$  клеток/лунка) переносили в полипропиленовый 96-луночный планшет с V-образным дном и предварительно охлаждали в холодильнике при 5°C в течение 10 мин. Образцы анти-**HLA-G** антител разбавляли в окрашивающем буферном растворе до двукратной исходной концентрации 80 мкг/мл. Затем готовили серию 4-кратных разбавлений антител и раствор антитела в количестве 25 мкл/лунка добавляли в полученные клетки и затем инкубировали в течение 1 ч при 5°C. Клетки промывали дважды окрашивающим буферным раствором в количестве 200 мкл/лунка и центрифугировали при 300 g в течение 3 мин. Для детектирования флуоресцентно меченных антивидовых антител (козьи антитела к IgG крысы (H+L), конъюгированные с Alexa 488, Life technologies # A11006, или козьи антитела к IgG мыши (H+L), Life technologies # A11001) или козьи антитела к IgG человека (H+L), конъюгированные с Alexa 488, Life technologies # A11013) их разбавляли до 20 мкг/мл в окрашивающем буферном растворе и клеточные осадки ресуспендировали в 50 мкл/лунка раствора детектируемого антитела. После инкубации в течение 1 ч при 5°C клетки снова дважды промывали окрашивающим буферным раствором, ресуспендировали в 70 мкл окрашивающего буферного раствора и связывание оценивали методом FACS Canto II.

Пример окрашивания FACS для анти-**HLA-G** антител **HLA-G 0031**, **HLA-G 0039**, **HLA-G 0041** и **HLA-G 0090** приведен на графиках совмещения FACS, фиг. 4.

#### Пример 6

Анти-**HLA-G** антитела ингибируют/модулируют связывание **ILT2** с **HLA-G**, который экспрессируется на клетках **JEG3**

Для анализа клетки **JEG3** (ATCC HTB36) окрашивали гибридными белками **ILT2-Fc** (контроль = отсутствие ингибирования) в присутствии или в отсутствие предварительной инкубации с различными анти-**HLA-G** антителами. Для предварительной инкубации с антителами anti-**HLA-G**, 25 мкл/лунка клеточной суспензии переносили в полипропиленовый 96-луночный планшет с V-образным дном и предварительно охлаждали при 4°C в течение 10 мин. Анти-**HLA-G** антитела или эталонные антитела (**G233**, **MEM-G/9** или **87G**) разбавляли в окрашивающем буферном растворе до двукратной концентрации 80 мкг/мл и в полученные клетки добавляли 25 мкл/лунка раствора антитела и инкубировали в течение 1 ч при 5°C. Клетки дважды промывали 200 мкл/лунка окрашивающего буферного раствора, центрифугировали при 300 g в течение 3 мин и затем ресуспендировали в 25 мкл/лунка окрашивающего буферного раствора.

Определение гибридного белка **ILT2-Fc Chimera** человека (RD #2017-T2-050) на а) клетках **JEG3**, предварительно инкубированных в присутствии анти-**HLA-G** антител mAb или б) на необработанных клетках **JEG3** в качестве сравнения проводили следующим образом. Краткое описание анализа: **ILT2-Fc** или контрольный IgG человека (Jackson-Immuno-Research # 009-000-003) разбавляли в окрашивающем буферном растворе до двукратной концентрации 20 мкг/лунка (**ILT2**) и в полученные клетки добавляли 25 мкл/лунка раствора белка **ILT2-Fc**, и затем инкубировали в течение 2 ч при 5°C. Клетки снова промывали дважды 200 мкл/лунка окрашивающего буферного раствора, и белок **ILT2-Fc** человека определяли с использованием флуоресцентно меченого антитела, специфичного к IgG Fc-γ человека (фрагмент (F(ab')<sub>2</sub> козьего антитела к IgG человека, Fcγ-специфичный фрагмент FITC (Jackson-Immuno-Research # 109-096-008) при разбавлении 10 мкг/мл в окрашивающем буферном растворе. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл/лунка детектируемого антитела. После инкубации в течение

1 ч при 5°C клетки дважды промывали окрашивающим буферным раствором, ресуспендировали в 70 мкл и связывание ILT2 с клетками JEG 3 оценивали на приборе FACS Canto II.

В качестве контроля анти-HLA-G антитела, связанные с предварительно инкубированными клетками JEG-3, определяли с использованием антивидовых антител: козье антитело к IgG крысы (H+L), конъюгированное с Alexa 488 (Life technologies # A11006), или козье антитело к IgG мыши (H+L)-Alexa 488, (Life technologies, # A11001) при концентрации 10 мкг/мл.

На графике (фиг. 5) представлена соответствующая способность различных антител HLA-G изменять взаимодействие и связывание рекомбинантного ILT2 с HLA-G, экспрессируемым на опухолевых клетках JEG3.

В приведенной ниже таблице суммированы результаты экспериментов. Связывание анти-HLA-G антител с клетками JEG3, обозначенное как +, означает слабое связывание, +++ означает сильное связывание. Способность анти-HLA-G антител либо ингибировать/блокировать либо усиливать связывание ILT2 с HLA-G, экспрессируемым клетками JEG3. В последнем столбце показано/количественно оценено связывание рекомбинантного ILT2 с клетками или ингибирование/блокирование (окрашивание ILT2-Fc в отсутствие анти-HLA-G антител означает 100% связывание, то есть 0% ингибирование, отрицательная величина указывает на еще более увеличенное связывание, различие в сигналах окрашивания менее 5% означает отсутствие эффекта).

Антитело	Связывание на клетках JEG-3	Взаимодействие HLA-G/ILT2	Ингибирование связывания ILT2 с клетками JEG3
В отсутствии mAb (контроль)	-	-	0% ингибирование =100% связывание
HLA-G-0031	+++	Ингибирует связывание ILT2	Ингибирование 95,1%
HLA-G-0039	+++	Увеличивает связывание ILT2	-72,9% (=увеличение/стимуляция связывания ILT2)
HLA-G-0041	+++	Увеличивает связывание ILT2	-76,7% (=увеличение/стимуляция связывания ILT2)
HLA-G-0090	+++	Ингибирует связывание ILT2	Ингибирование 91,8%
87G	++	Значимый эффект отсутствует	Ингибирование 2,3%
MEM-G/9	+++	Ингибирует связывание ILT2	-27,9% (=увеличение/стимуляция связывания ILT2)
G233	+++	Ингибирует связывание ILT2	-55,8% (=увеличение/стимуляция связывания ILT2)

#### Пример 7

Анализ восстановления моноцитов-цитокинов (после HLA-G-опосредованного подавления)

В описанном ниже анализе совместного культивирования для функциональной характеристики различных моноклональных антител крысы к HLA-G человека использовали HLA-G-экспрессирующие клетки с моноцитами. Периферические моноциты человека выделяли из крови здоровых доноров. Краткое описание анализа: кровь отбирали в пробирки, содержащие антикоагуляционный агент, и разбавляли в соотношении 1:2 в PBS. Для выделения периферических мононуклеарных клеток (PBMC) по 30 мл смеси переносили в пробирки Leucoser, уже содержащие среду для разделения. После центрифугирования в течение 12 мин (1200xg без торможения) собирали специфическую полосу PBMC, которую промывали 3 раза PBS и центрифугировали в течение 10 мин при 300xg. И наконец, клеточные осадки ресуспендировали в буферном растворе MACS фирмы Miltenyi и моноциты человека выделяли из PBMC с использованием магнитного разделения и набора II для выделения моноцитов человека фирмы Miltenyi (#130-091-153) согласно инструкции фирмы-изготовителя (отрицательная селекция). Выделенные моноциты ресуспендировали в культуральной среде первичных клеток (RPMI 1640, PAN #P04-17500, дополненной 10% FCS, Gibco #10500, 2 mM L-глутамин, Sigma #G7513, 1 mM пируват натрия, Gibco #11360, заменимые аминокислоты MEM, Gibco #11140, 0,1 mM 2-меркаптоэтанол, Gibco #31350, MEM витамины, Gibco #11120, пенициллин-стрептомицин, Gibco #15140) с плотностью  $5 \times 10^5$  клеток/мл.

Обогащение клетками CD 14<sup>+</sup> CD 16<sup>+</sup> контролировали проточной цитометрией и анализировали экспрессию ILT2 и ILT4 клетками. Для анализа совместного культивирования моноцитов, обогащенных клетками, экспрессирующими HLA-G, клетки JEG-3 ((ATCC HTB36) высевали за 1 день до анализа в 96-луночный плоскодонный культуральный планшет в количестве  $8 \times 10^3$  клеток/лунка в 100 мкл культуральной среды JEG-3 (среда MEM Eagle, содержащая EBSS и L-глутамин, PAN #P04-00509, дополненная 10% FCS, Gibco #10500, 1 mM пируват натрия, Gibco #11360, заменяемые аминокислоты MEM Gibco #11140), при этом в день анализа формировался непрерывный слой. В некоторых экспериментах использовали клеточную линию JEG-3, нокаунтную в отношении HLAG, которую высевали аналогично тому, как описано выше для клеток JEG-3 wt. Адгезивные клетки JEG-3 предварительно инкубировали в формате 4-кратного серийного разведения анти-HLA-G антител в первичной клеточной культуре. Затем удаляли супернатант из адгезивных клеток JEG-3 и полученный раствор антител добавляли в количестве 50 мкл/лунка и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере в течение 1 ч. Моноциты человека добавляли в анти-HLA-G антитела, предварительно инкубированные клетки JEG-3 (в количестве  $2,5 \times 10^4$  моноцитов человека/лунка в 50 мкл первичной культуральной среды) и совместную культуру инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере в течение ночи (приблизительно 18-20 ч). На следующий день проводили стимуляцию LPS с использованием 50 нг/мл LPS в течение 7 ч и затем собирали супернатант совместной культуры. Концентрацию TNF $\alpha$ , в супернатанте совместной культуры определяли с использованием ИФА (набор Human TNF alpha Ready-SET-Go!<sup>®</sup> фирмы eBioscience (#88-7346-88)).

В приведенных ниже таблицах представлены функциональные характеристики указанных антител HLA-G для конкретного донора при различных характеристиках антитела.

#### Таблицы

Функциональные анти-HLA-G антитела способны восстанавливать подавленный специфический иммунный ответ HLA-G, т.е. восстановление LPS-опосредованного

продуцирования TNF $\alpha$  моноцитами в совместной культуре с HLA-G-экспрессирующими клетками: Высвобождение TNF (восстановление) (%) функциональными анти-HLA-G антителами

Функциональные анти-HLA-G антитела способны индуцировать (восстанавливать) подавленный) иммунный ответ, т.е. восстановление LPS-опосредованного продуцирования TNF $\alpha$  моноцитами в совместной культуре с HLA-G-экспрессирующими клетками (в качестве отрицательного контроля специфичного к HLAG индуцирования TNF использовали клеточную линию, нокаунтную в отношении HLAG, чтобы различить, какие антитела индуцируют или не индуцируют TNF (действительно специфичные к HLA-G) или индуцируют TNF на клеточной линии, нокаунтной в отношении HLAG (которые не могут быть специфичными в отношении HLAG).

Величины индукции TNF (%) анти-HLA-G антител рассчитывали с использованием следующего условия: необработанная совместная культура клеток JEG3 и моноцитов = 0%, культура только моноцитов (в отсутствии подавления, индуцированного HLA-G) = 100%.

Клеточная линия	JEG-3 HLAG нокаунтные (ko)	JEG-3 дикого типа (wt)	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt
Анти-HLA-G антитело	HLAG-0031	HLAG-0031	HLAG-0041	HLAG-0041	87G	87G	G223	G223
40 мкг/мл	-20%	275%	12%	53%	86%	150%	154%	144%
10 мкг/мл	6%	216%	16%	41%	40%	85%	50%	104%
2,5 мкг/мл	-40%	170%	-13%	63%	3%	38%	29%	63%
0,63 мкг/мл	-23%	83%	-18%	34%	-8%	20%	5%	33%
0,16 мкг/мл	-29%	23%	-1%	43%	-12%	25%	0%	20%
Необработанный	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Только моноциты	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Данные, представленный выше в таблице, свидетельствуют о том, что антитела по настоящему изобретению способны индуцировать высвобождение TNF $\alpha$ , в совместной культуре моноцитов с клетками JEG-3, экспрессирующими HLA-G, в то время как они не способны индуцировать высвобождение TNF $\alpha$ , в совместной культуре моноцитов с клетками JEG-3, нокаунтными в отношении HLA-G.

Данные, представленные в таблице, явно свидетельствуют о том, что эталонные антитела не являются действительно специфичными к HLA-G, поскольку они индуцируют сильное высвобождение TNF $\alpha$  также и в клеточных линиях, нокаунтных в отношении HLA-G.

Высвобождение TNF (восстановленное) (%) изменяется в зависимости от донора (ниже приведены различные доноры).

Клеточная линия	JEG-3 дикого типа (wt)	JEG-3 дикого типа (wt)	JEG-3 дикого типа (wt)
Анти-HLA-G антитело	HLAG-0090	HLAG-0031	HLAG-0041
5 40 мкг/мл	214%	77%	
10 мкг/мл	221%	74%	40%
2,5 мкг/мл	233%	67%	59%
0,63 мкг/мл	219%	44%	66%
10 0,16 мкг/мл	198%	14%	44%
Необработанные	0%	0%	0%
Только моноциты	100%	100%	100%

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

15 <110> Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОЩ АГ  
 <120> АНТИТЕЛА АНТИ-HLA-G И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ  
 <130> P34773-WO  
 <150> EP18168011.7  
 <151> 2018-04-18

20 <160> 55  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT

25 <213> rat  
 <400> 1  
 Asp Tyr Trp Val Ser  
 1 5  
 <210> 2

30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> rat  
 <400> 2  
 Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe

35 1 5 10 15  
 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> rat

40 <400> 3  
 Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 4  
 <211> 12

45 <212> PRT  
 <213> rat  
 <400> 4  
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn His Leu His

RU 2797724 C2

```

1           5           10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
5 <213> rat
<400> 5
Ser Thr Ser Gln Arg Ala Ser
1           5
<210> 6
10 <211> 9
<212> PRT
<213> rat
<400> 6
Gln Gln Gly Ser Ser Asn Pro Tyr Thr
15 1           5
<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> rat
20 <400> 7
Gln Val Lys Leu Met Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Thr
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Asn Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20           25           30
25 Trp Val Ser Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35           40           45
Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe
50           55           60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
30 65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85           90           95
Thr Arg Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100           105           110
35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115           120
<210> 8
<211> 108
<212> PRT
40 <213> rat
<400> 8
Ala Ile Val Leu Asn Gln Ser Pro Ser Ser Ile Val Ala Ser Gln Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
45 20           25           30
His Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Phe Pro Lys Phe Val
35           40           45
Ile Tyr Ser Thr Ser Gln Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser

```



<213> human  
 <400> 14  
 Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr  
 1 5  
 5 <210> 15  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 15  
 10 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 15 35 40 45  
 Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Ser  
 65 70 75 80  
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 25 115 120  
 <210> 16  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> human  
 30 <400> 16  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 35 Ser Lys Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 40 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 45 Lys  
 <210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT

<213> human  
 <400> 17  
 Thr Tyr Gly Met Ser  
 1 5  
 5 <210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 18  
 10 Val Ile Ser Gly Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 19  
 <211> 14  
 15 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 19  
 Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 20 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 20  
 25 Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Ala  
 <210> 21  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 21  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5  
 35 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 22  
 40 Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr  
 1 5  
 <210> 23  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 45 <213> human  
 <400> 23  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

RU 2797724 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 5 Ser Val Ile Ser Gly Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 10 85 90 95  
 Ala Lys Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 15 <210> 24  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 24  
 20 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 G  
 lu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 25 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 30 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 35 Lys  
 <210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> human  
 40 <400> 25  
 Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 18  
 45 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 26  
 Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val



RU 2 797 724 C2

Tyr Tyr Cys Ala Ser Val Arg Ala Val Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
                   100                                  105                                  110  
 Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                                  120  
 5 <210> 32  
    <211> 113  
    <212> PRT  
    <213> human  
    <400> 32  
 10 A  
 sp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1                  5                                  10                                  15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser  
                   20                                  25                                  30  
 15 Ser Asn Asn Lys Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Gln  
                   35                                  40                                  45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
                   50                                  55                                  60  
 20 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65                  70                                  75                                  80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln  
                   85                                  90                                  95  
 Tyr Tyr Arg Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
                   100                                  105                                  110  
 25 Lys  
    <210> 33  
    <211> 120  
    <212> PRT  
    <213> artificial  
 30 <220>  
    <223> humanized variant heavy chain variable domain VH, HLA-G-0031-0104  
           (HLA-G-0104)  
    <400> 33  
 35 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                  5                                  10                                  15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                                  25                                  30  
 Trp Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met  
                   35                                  40                                  45  
 40 Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe  
                   50                                  55                                  60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65                  70                                  75                                  80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                                  90                                  95  
 45 Thr Arg Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
                   100                                  105                                  110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

RU 2 797 724 C2

115 120

<210> 34  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
 <220>  
 <223> humanized variant light chain variable domain VL, HLA-G-0031-0104  
 (HLA-G-0104)  
 <400> 34

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 His Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu  
 15 35 40 45  
 Ile Tyr Ser Thr Ser Gln Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80  
 20 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Asn Pro  
 85 90 95  
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 35  
 25 <211> 314  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 35

30 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln  
 20 25 30  
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg  
 35 40 45  
 35 Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr  
 50 55 60  
 Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln  
 40 85 90 95  
 Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly  
 100 105 110  
 Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu  
 115 120 125

45 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys  
 130 135 140  
 Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu  
 145 150 155 160



RU 2797724 C2

```

                180                185                190
Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
                195                200                205
5  Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
    210                215                220
Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225                230                235                240
Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
                245                250                255
10 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
    260                265                270
Arg Trp
<210> 37
<211> 99
15 <212> PRT
    <213> homo sapiens
    <400> 37
    I
le Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
20 1                5                10                15
Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
                20                25                30
Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
                35                40                45
25 Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
    50                55                60
Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65                70                75                80
Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
30                85                90                95
Arg Asp Met
<210> 38
<211> 275
<212> PRT
35 <213> Artificial
    <220>
    <223> modified human HLA-G (wherein the HLA-G specific amino acids have
        been replaced by HLA-A consensus amino acids (= degrafted HLA-G)
        ECD
40 <400> 38
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
1                5                10                15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
                20                25                30
45 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Glu Pro Arg
    35                40                45
Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr
50                55                60

```

RU 2797724 C2

Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Val Asn Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln  
 85 90 95  
 5 Trp Met Ile Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly  
 100 105 110  
 Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu  
 115 120 125  
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys  
 10 130 135 140  
 Arg Lys Cys Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys  
 165 170 175  
 15 Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His  
 180 185 190  
 Pro Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe  
 195 200 205  
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln  
 20 210 215 220  
 Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg  
 245 250 255  
 25 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu  
 260 265 270  
 Arg Trp Lys  
 275  
 <210> 39  
 30 <211> 341  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 39  
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly  
 35 1 5 10 15  
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln  
 20 25 30  
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg  
 35 40 45  
 40 Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr  
 50 55 60  
 Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln  
 45 85 90 95  
 Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly  
 100 105 110  
 Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu

RU 2797724 C2

	115		120		125											
	Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Lys
	130						135					140				
	His	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala	His	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu
5	145					150				155						160
	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys
				165						170					175	
	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	Ala	Pro	Lys	Thr	His	Met	Thr	His	His
				180						185					190	
10	Ala	Val	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe
			195						200					205		
	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln
	210						215					220				
	Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr
15	225					230					235					240
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
				245						250					255	
	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Gln	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu
				260					265					270		
20	Arg	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Ile	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ile
			275					280						285		
	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Ala
			290				295					300				
	Ala	Val	Met	Trp	Arg	Arg	Lys	Ser	Ser	Asp	Arg	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr
25	305					310					315					320
	Ser	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Asp	Val	Ser	Leu
				325						330					335	
	Thr	Ala	Cys	Lys	Val											
				340												
30	<210>	40														
	<211>	275														
	<212>	PRT														
	<213>	homo sapiens														
	<400>	40														
35	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly
	1			5						10					15	
	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln
			20						25					30		
	Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Gln	Arg	Met	Glu	Pro	Arg
40			35					40					45			
	Ala	Pro	Trp	Ile	Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Gly	Glu	Thr
			50				55					60				
	Arg	Lys	Val	Lys	Ala	His	Ser	Gln	Thr	His	Arg	Val	Asp	Leu	Gly	Thr
	65				70						75					80
45	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Val	Gln
				85						90					95	
	Arg	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Ser	Asp	Trp	Arg	Phe	Leu	Arg	Gly
			100							105					110	

RU 2797724 C2

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu  
 115 120 125  
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys  
 130 135 140  
 5 His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys  
 165 170 175  
 10 Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His  
 180 185 190  
 Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe  
 195 200 205  
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln  
 210 215 220  
 15 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg  
 245 250 255  
 20 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu  
 260 265 270  
 Arg Trp Glu  
 275  
 <210> 41  
 <211> 275  
 25 <212> PRT  
 <213> mus musculus  
 <400> 41  
 Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly  
 1 5 10 15  
 30 Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln  
 20 25 30  
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg  
 35 40 45  
 35 Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr  
 50 55 60  
 Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln  
 85 90 95  
 40 Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly  
 100 105 110  
 Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu  
 115 120 125  
 45 Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg  
 130 135 140  
 Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn

RU 2797724 C2

				165					170					175			
	Glu	Thr	Leu	Leu	Arg	Thr	Asp	Ser	Pro	Lys	Ala	His	Val	Thr	Tyr	His	
				180					185					190			
5	Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	
			195					200					205				
	Tyr	Pro	Ala	Asp	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	
			210				215					220					
	Thr	Gln	Asp	Met	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	
	225					230					235					240	
10	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Leu	Gly	Lys	Glu	Gln	Asn	
				245						250				255			
	Tyr	Thr	Cys	His	Val	His	His	Lys	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	
				260					265					270			
	Arg	Trp	Lys														
15			275														
	<210>	42															
	<211>	274															
	<212>	PRT															
	<213>	rat															
20	<400>	42															
	Gly	Ser	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	
	1			5						10					15		
	Leu	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Glu	
				20						25				30			
25	Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Glu	Asn	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	
			35					40					45				
	Ala	Arg	Trp	Met	Glu	Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Glu	Gln	Gln	Thr	
			50				55					60					
	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Trp	Glu	Gln	Ile	Tyr	Arg	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	
30	65				70						75					80	
	Leu	Arg	Gly	Cys	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Ile	Gln	
				85						90					95		
	Glu	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Leu	Arg	Gly	
				100						105					110		
35	Tyr	Arg	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Asn	Glu	
			115					120					125				
	Asp	Leu	Lys	Thr	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ala	Ala	Gln	Ile	Thr	Arg	
			130				135					140					
	Asn	Lys	Trp	Glu	Arg	Ala	Arg	Tyr	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	
40	145				150						155					160	
	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Leu	Glu	Leu	Gly	Lys	
				165						170					175		
	Glu	Thr	Leu	Leu	Arg	Ser	Asp	Pro	Pro	Glu	Ala	His	Val	Thr	Leu	His	
				180						185				190			
45	Pro	Arg	Pro	Glu	Gly	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	
			195					200					205				
	Tyr	Pro	Ala	Asp	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	
			210				215						220				

RU 2797724 C2

Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn  
 245 250 255  
 5 Tyr Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln  
 260 265 270  
 Arg Trp  
 <210> 43  
 <211> 440  
 10 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 43  
 Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10 15  
 15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln  
 20 25 30  
 Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn  
 35 40 45  
 20 Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro  
 85 90 95  
 25 Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 30 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe  
 165 170 175  
 35 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala  
 180 185 190  
 Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg  
 195 200 205  
 40 Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu  
 210 215 220  
 Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp  
 225 230 235 240  
 Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr  
 245 250 255  
 45 Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp  
 260 265 270  
 Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg  
 275 280 285

RU 2 797 724 C2

Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu  
 290 295 300  
 Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 5 Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro  
 325 330 335  
 Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr  
 340 345 350  
 Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr  
 10 355 360 365  
 Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe  
 370 375 380  
 Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr  
 385 390 395 400  
 15 Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg  
 405 410 415  
 Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
 420 425 430  
 His Glu His His His His His His  
 20 435 440  
 <210> 44  
 <211> 441  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> exemplary modified human HLA-G  $\beta$ 2M MHC class I complex (wherein  
 the HLA-G specific amino acids have been replaced by HLA-A  
 consensus amino acids (= degrafted HLA-G)  
 <400> 44  
 30 Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln  
 20 25 30  
 Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn  
 35 35 40 45  
 Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 40 Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro  
 85 90 95  
 Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser  
 45 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg



RU 2797724 C2

Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe  
 65 70 75 80  
 5 Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro  
 85 90 95  
 Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala  
 100 105 110  
 10 Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu  
 145 150 155 160  
 15 Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe  
 165 170 175  
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala  
 180 185 190  
 20 Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln  
 195 200 205  
 Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala  
 210 215 220  
 Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg  
 225 230 235 240  
 25 Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr  
 245 250 255  
 Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp  
 260 265 270  
 30 Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg  
 275 280 285  
 Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu  
 290 295 300  
 Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu  
 305 310 315 320  
 35 Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro  
 325 330 335  
 Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr  
 340 345 350  
 40 Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr  
 355 360 365  
 Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe  
 370 375 380  
 Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 45 Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg  
 405 410 415  
 Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu  
 420 425 430

Trp His Glu His His His His His His His  
 435 440  
 <210> 46  
 <211> 441  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> exemplary human HLA-G/ mouse H2Kd  $\beta$ 2M MHC class I complex wherein  
 the positions specific for human HLA-G are grafted onto the mouse  
 10 H2Kd framework  
 <400> 46  
 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln  
 15 20 25 30  
 Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn  
 35 40 45  
 Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu  
 50 55 60  
 20 Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro  
 85 90 95  
 Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala  
 25 100 105 110  
 Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 30 Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe  
 165 170 175  
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Ser Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala  
 35 180 185 190  
 Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln  
 195 200 205  
 Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Met Ser Leu Gln Thr Ala  
 210 215 220  
 40 Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Phe Gln Arg  
 225 230 235 240  
 Met Phe Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr  
 245 250 255  
 Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp  
 45 260 265 270  
 Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Lys Arg  
 275 280 285  
 Lys Trp Glu Ala Ala Asn Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu

RU 2797724 C2

	290		295		300												
	Gly	Glu	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305						310				315					320	
	Met	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	Ser	Pro	Lys	Ala	His	Val	Thr	His	His	Pro	
5					325					330					335		
	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr	
				340					345					350			
	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Thr	
			355					360					365				
10	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	
		370					375					380					
	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	
	385				390						395					400	
	Thr	Cys	His	Val	Gln	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Met	Leu	Arg	
15				405						410					415		
	Trp	Lys	Gly	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	
			420					425						430			
	Trp	His	Glu	His	His	His	His	His	His								
		435						440									
20	<210>	47															
	<211>	440															
	<212>	PRT															
	<213>	rat															
	<400>	47															
25	Ala	Gln	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Arg	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	1			5						10				15			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Gln	Lys	Thr	Pro	Gln	Ile	Gln	
			20					25					30				
	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Lys	Pro	Asn	Phe	Leu	Asn	
30			35					40					45				
	Cys	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	His	Pro	Pro	Gln	Ile	Glu	Ile	Glu	Leu	Leu	
	50						55					60					
	Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Glu	Met	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	
	65				70					75						80	
35	Ser	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Tyr	Ile	Leu	Ala	His	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro	
			85							90					95		
	Thr	Glu	Thr	Asp	Val	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Lys	His	Val	Thr	Leu	Lys	
			100						105					110			
	Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Thr	Trp	Asp	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
40			115					120					125				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		130						135					140				
	Ser	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Leu	
	145				150						155					160	
45	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Glu	Phe	
				165						170					175		
	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Glu	Asn	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala	
			180						185					190			

RU 2 797 724 C2

Arg Trp Met Glu Arg Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr Arg  
195 200 205  
Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Val Asp Leu Arg Thr Leu  
210 215 220  
5 Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Gly Gly Ser His Thr Ile Gln Glu  
225 230 235 240  
Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Tyr  
245 250 255  
10 Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp  
260 265 270  
Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg Asn  
275 280 285  
Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu  
290 295 300  
15 Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys Glu  
305 310 315 320  
Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His Pro  
325 330 335  
20 Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr  
340 345 350  
Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr  
355 360 365  
Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe  
370 375 380  
25 Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr  
385 390 395 400  
Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln Arg  
405 410 415  
30 Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
420 425 430  
His Glu His His His His His His  
435 440  
<210> 48  
<211> 440  
35 <212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> exemplary human HLA-G/ rat RT1A  $\beta$ 2M MHC class I complex wherein  
the positions specific for human HLA-G are grafted onto the rat  
40 RT1A framework  
<400> 48  
Ala Gln Phe Ser Ala Ser Ala Ser Arg Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly  
1 5 10 15  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln  
45 20 25 30  
Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn  
35 40 45  
Cys Tyr Val Ser Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu

RU 2797724 C2

	50					55						60					
	Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Glu	Met	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	
	65					70					75					80	
	Ser	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Tyr	Ile	Leu	Ala	His	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro	
5						85					90					95	
	Thr	Glu	Thr	Asp	Val	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Lys	His	Val	Thr	Leu	Lys	
						100					105					110	
	Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Thr	Trp	Asp	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
						115					120					125	
10	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
						130					135					140	
	Ser	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Leu	
	145					150					155					160	
	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Glu	Phe	
15						165					170					175	
	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala	
						180					185					190	
	Pro	Trp	Val	Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Glu	Gln	Gln	Thr	Arg	
						195					200					205	
20	Ile	Ala	Lys	Glu	Trp	Glu	Gln	Ile	Tyr	Arg	Met	Asp	Leu	Gln	Thr	Leu	
						210					215					220	
	Arg	Gly	Cys	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	His	Thr	Ile	Gln	Glu	
	225					230					235					240	
	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Leu	Gly	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr	
25						245					250					255	
	Arg	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Asn	Glu	Asp	
						260					265					270	
	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ala	Ala	Gln	Ile	Thr	Lys	Arg	
						275					280					285	
30	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala	Asn	Tyr	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	
						290					295					300	
	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
	Met	Leu	Gln	Arg	Ala	Asp	Pro	Pro	Glu	Ala	His	Val	Thr	His	His	Pro	
35						325					330					335	
	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr	
						340					345					350	
	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Thr	
						355					360					365	
40	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	
						370					375					380	
	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	
	385					390					395					400	
	Thr	Cys	Arg	Val	Gln	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Met	Leu	Arg	
45						405					410					415	
	Trp	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	
						420					425					430	
	His	Glu	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	

RU 2 797 724 C2

435 440

<210> 49  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> linker and his-Tag  
 <400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp  
 10 1 5 10 15  
 Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His  
 20 25 30

His  
 <210> 50  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> peptide  
 20 <400> 50

Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala  
 1 5  
 <210> 51  
 <211> 107  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 51

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 30 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

40 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 52  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo Sapiens  
 <400> 52

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 1 5 10 15

RU 2797724 C2

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 35 40 45  
 5 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 50 55 60  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 65 70 75 80  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 10 85 90 95  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105  
 <210> 53  
 <211> 328  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 53  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 20 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 25 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 30 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 35 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 40 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 45 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

RU 2 797 724 C2

245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 5 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 10 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325  
 <210> 54  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 15 <213> homo sapiens  
 <400> 54  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 30 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 35 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 40 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 45 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

RU 2797724 C2

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 5 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 10 325  
 <210> 55  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 15 <400> 55  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 25 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 30 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 35 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 40 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 45 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

	260		265		270														
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser			
			275					280					285						
	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser			
5			290				295					300							
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
	305					310					315					320			
	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu														
					325														

10

## (57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело, которое связывается с HLA-G человека, где антитело включает:

15 А) (a) домен VH, включающий: (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO:3, и (b) домен VL, включающий: (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, или

20 В) (a) домен VH, включающий: (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO:11, и (b) домен VL, включающий: (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, или

25 С) (a) домен VH, включающий: (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO:19, и (b) домен VL, включающий: (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, или

30 D) (a) домен VH, включающий: (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO:27, и (b) домен VL, содержащий: (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30.

2. Антитело по п. 1, где антитело включает:

А)

45 (iv) последовательность VH SEQ ID NO:7 и последовательность VL SEQ ID NO:8, или (v) гуманизированный вариант доменов VH и VL антитела по п. (iv), или (vi) последовательность VH SEQ ID NO:33 и последовательность VL SEQ ID NO:34,

или

В)

последовательность VH SEQ ID NO:15 и последовательность VL SEQ ID NO:16, или C)

последовательность VH SEQ ID NO:23 и последовательность VL SEQ ID NO:24, или D)

5 последовательность VH SEQ ID NO:31 и последовательность VL SEQ ID NO:32.

3. Анти-HLA-G антитело по п. 1 или 2, где антитело:

а) не проявляет перекрестную реактивность с модифицированным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС I человека, включающим последовательность SEQ ID NO:44, и/или

10 в) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом HLA-A2  $\beta$ 2M МНС класса I человека, включающим последовательность SEQ ID NO:39 и последовательность SEQ ID NO: 37, и/или

с) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом H2Kd  $\beta$ 2M МНС класса I мыши, включающим последовательность SEQ ID NO:45, и/или

15 д) не проявляет перекрестную реактивность с комплексом RT1A  $\beta$ 2M МНС класса I крысы, включающим последовательность SEQ ID NO:47, и/или

е) ингибирует связывание ILT2 с мономерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС класса I и/или

ф) ингибирует связывание ILT2 с тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС класса I, и/или

20 г) ингибирует связывание ILT2 с мономерным, и/или димерным, и/или тримерным комплексом HLA-G  $\beta$ 2M МНС класса I более чем на 50%, и/или

h) ингибирует связывание ILT2 с клетками JEG3; и/или

и) связывается (с HLA-G) на клетках JEG3 и ингибирует связывание ILT2 (с HLA-G) на клетках JEG3; и/или

25 j) ингибирует связывание CD8 с HLAG более чем на 80%.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой изотип IgG1.

5. Антитело по п. 4, где анти-HLA-G антитело представляет собой изотип IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G, где нумерация соответствует EU индексу Кабата.

30 6. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предыдущих пунктов.

7. Клетка-хозяин, предназначенная для продуцирования антитела по любому из предыдущих пунктов, включающая нуклеиновую кислоту по п. 6.

35 8. Способ продуцирования антитела, которое связывается с HLA-G человека, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 7, таким образом чтобы она продуцировала антитело.

9. Способ по п. 8, дополнительно включающий выделение антитела из клетки-хозяина.

40 10. Фармацевтический состав для лечения рака, включающий терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 1-5 и фармацевтически приемлемый носитель.

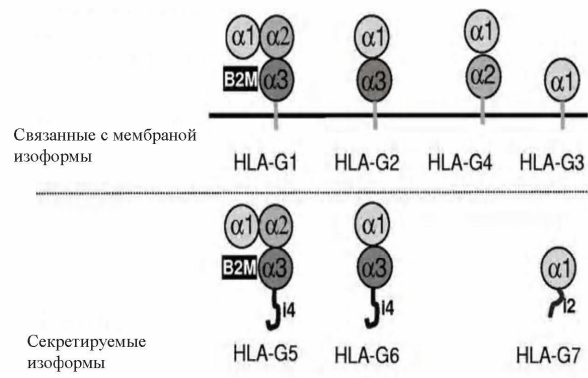
11. Применение антитела по любому из пп. 1-5 в качестве лекарственного средства для лечения рака.

12. Применение антитела по любому из пп. 1-5 для лечения рака.

45 13. Применение антитела по любому из пп. 1-5 для получения лекарственного средства для лечения рака.

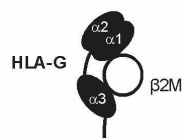
1

Фиг. 1



2

Фиг. 2А



Схематическое изображение структуры HLA-G дикого типа

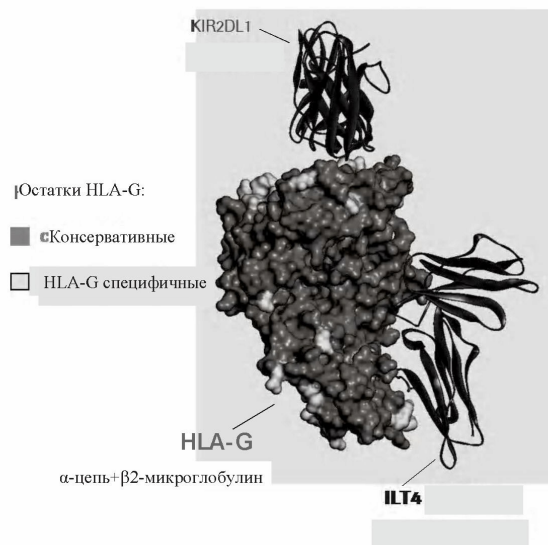


Взаимодействия KIR2DL4 и ILT2/4 воспроизведены на основе кристаллических структур: структура комплекса HLA-G:ILT4 (код PDB: 2DYP). Структура KIR2DL1 воспроизведена в соответствии с кодом PDB 1IM9 (структура комплекса KIR2DL1:HLA-Cw4 и расположена на структуре HLA-G при наложении структур HLA-Cw4 и HLA-G).

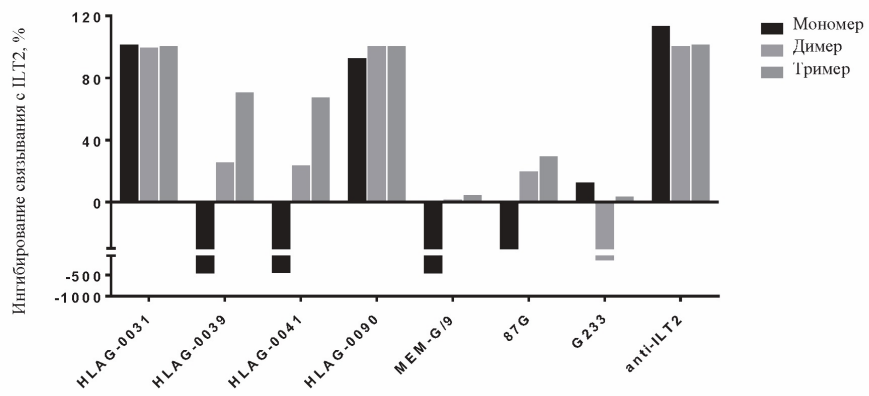


Схематическое изображение структуры гибридного HLA-G, которая была использована в качестве противоиантигена для идентификации HLA-G специфичных связывающих участков. Белыми точками обозначены поверхностные остатки, которые были идентифицированы как специфичные для HLA-G. Эти остатки были заменены на HLA-G консенсусную последовательность в гибридном соединении.

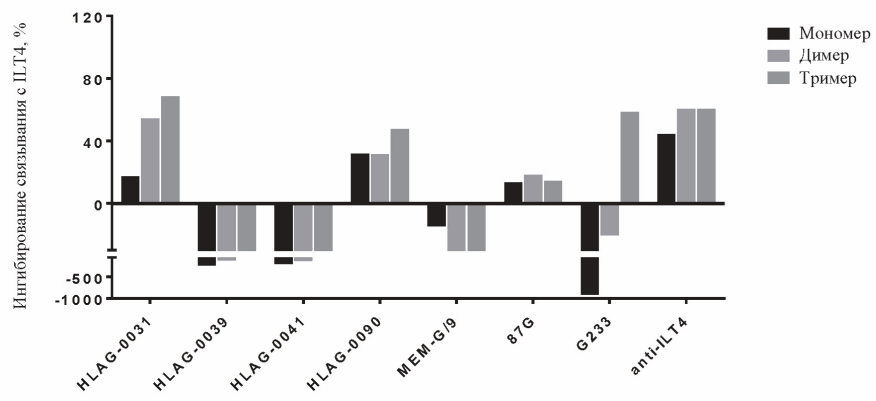
Фиг. 2Б



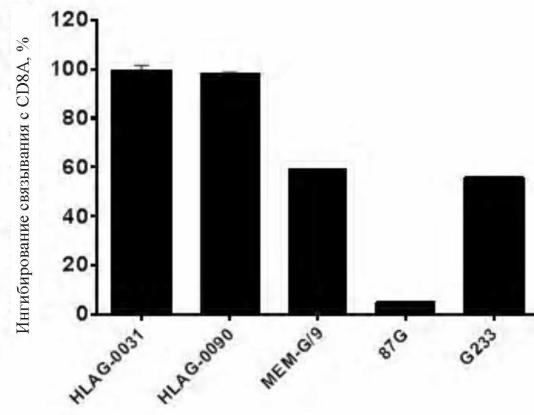
Фиг. 3А



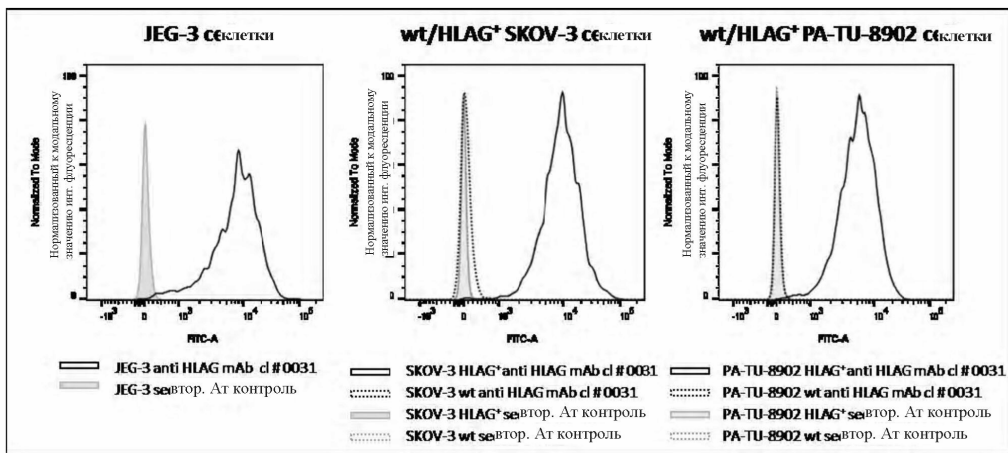
Фиг. 3Б



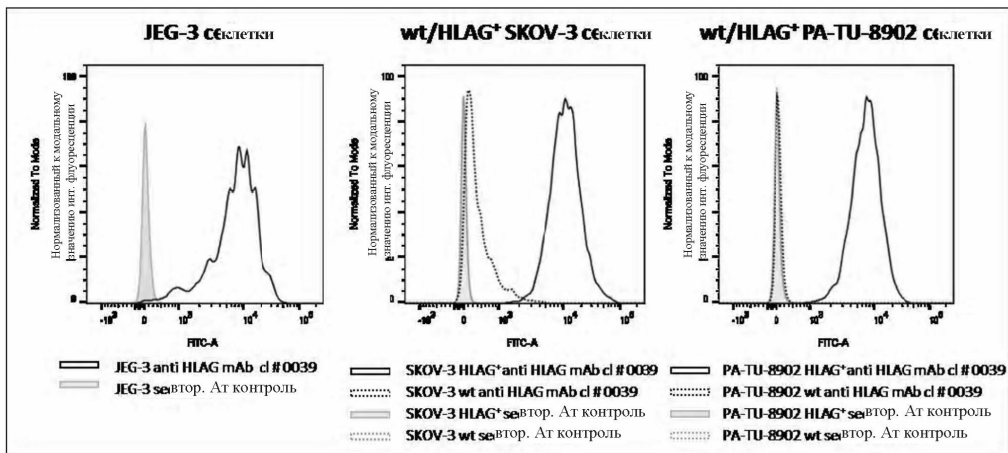
Фиг. 3В



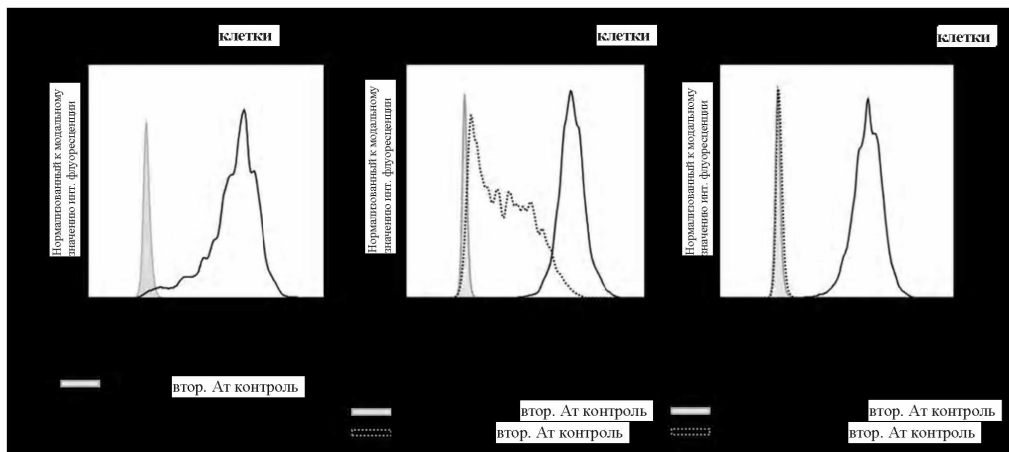
Фиг. 4А



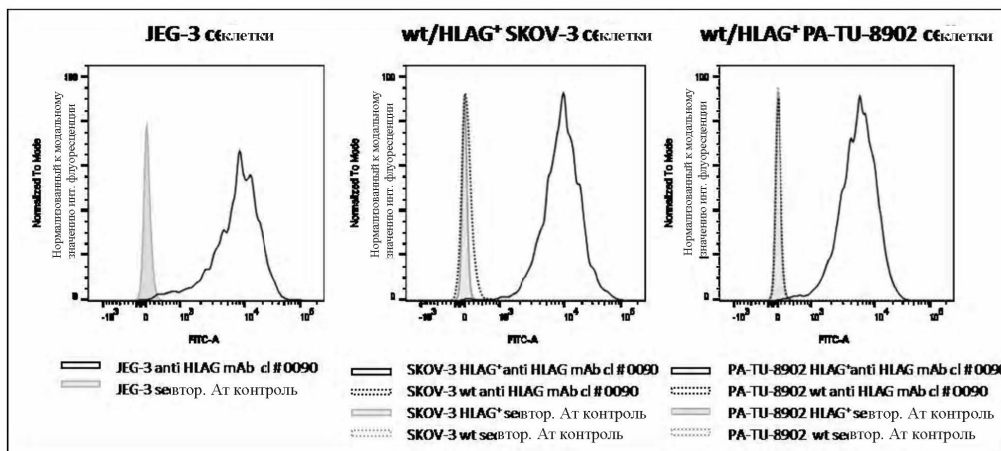
Фиг. 4Б



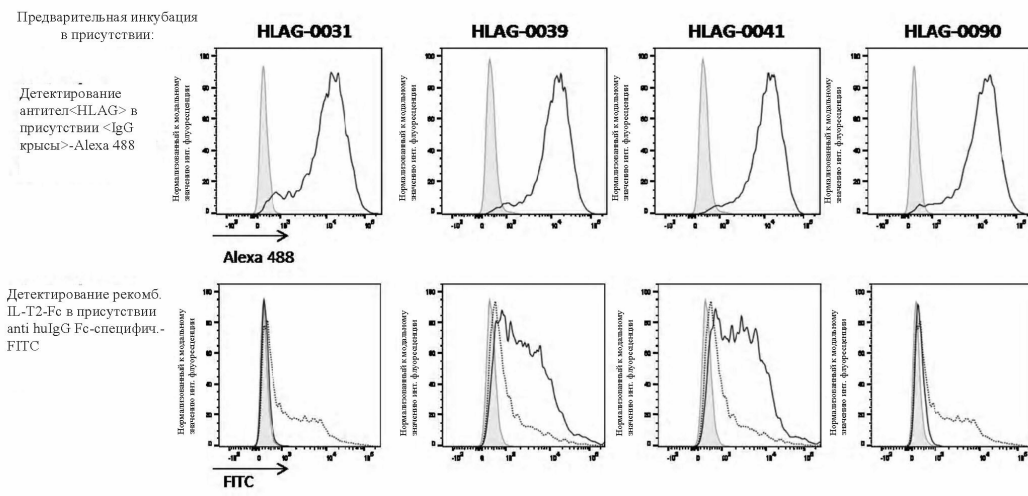
Фиг. 4В



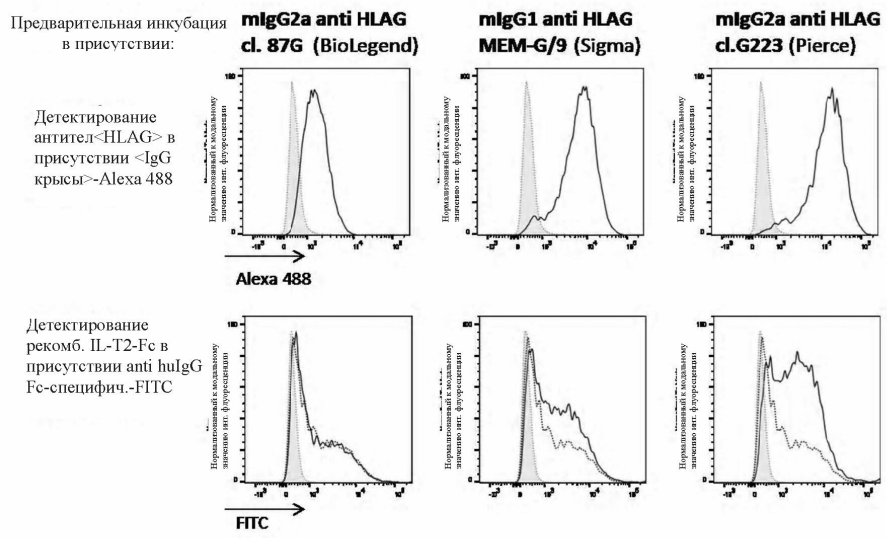
Фиг. 4Г



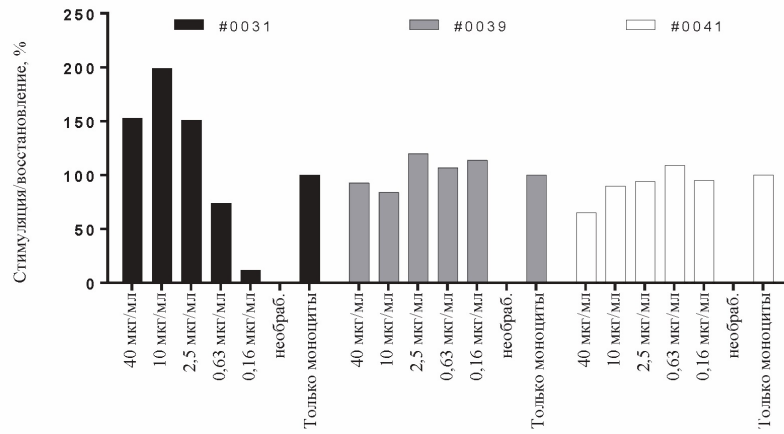
Фиг. 5А



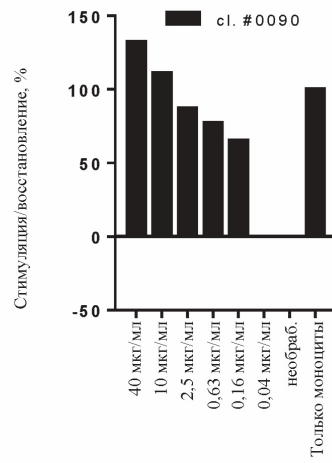
Фиг. 5Б



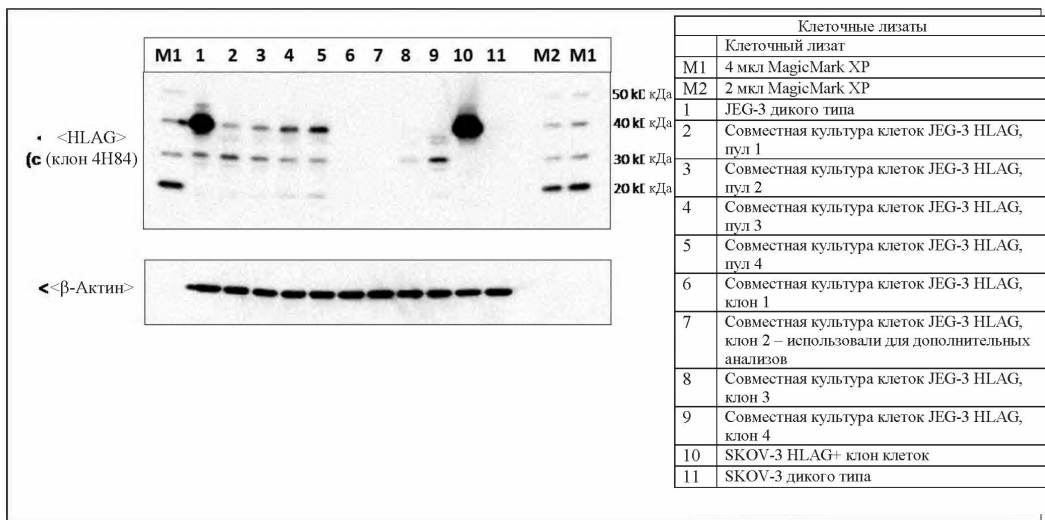
Фиг. 6А



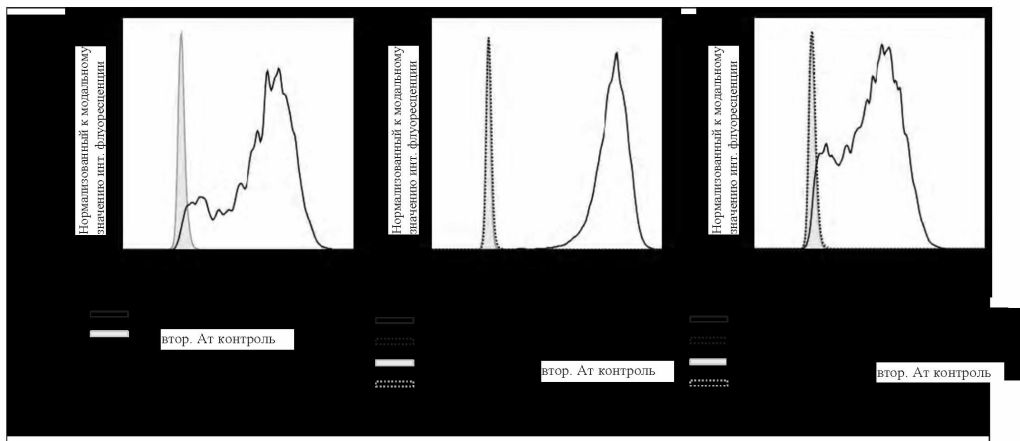
Фиг. 6Б



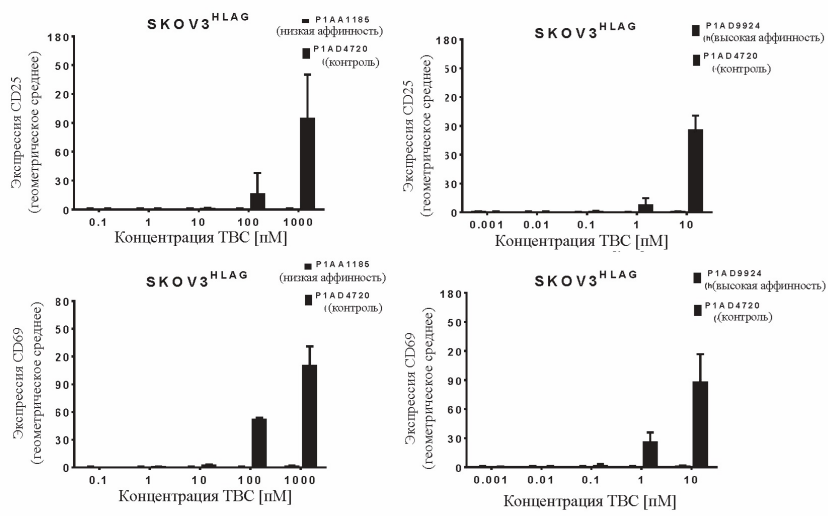
Фиг. 6В



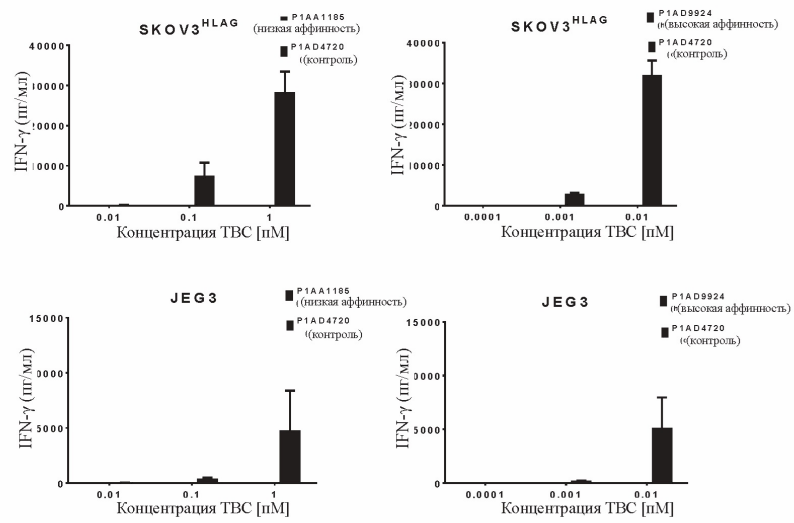
Фиг. 7



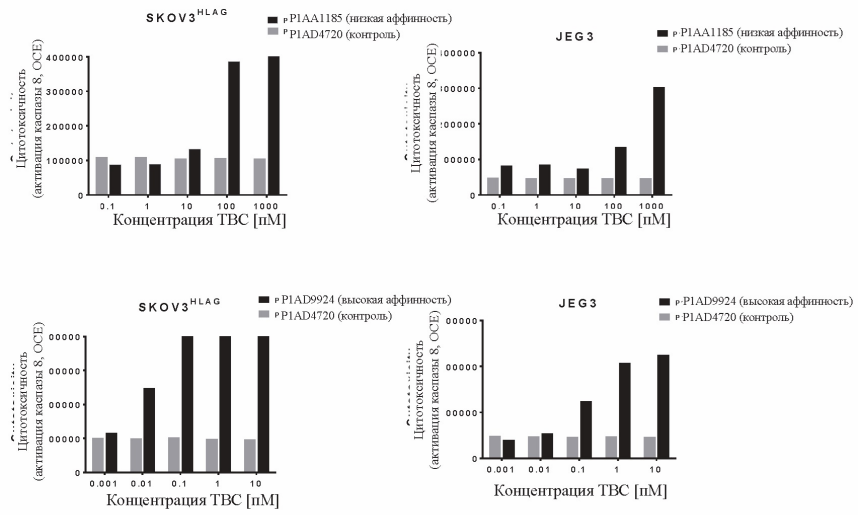
Фиг. 8



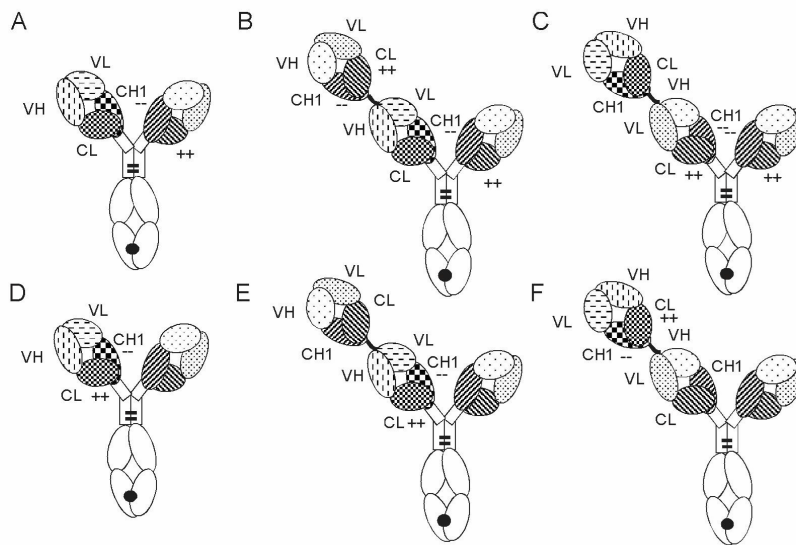
Фиг. 9



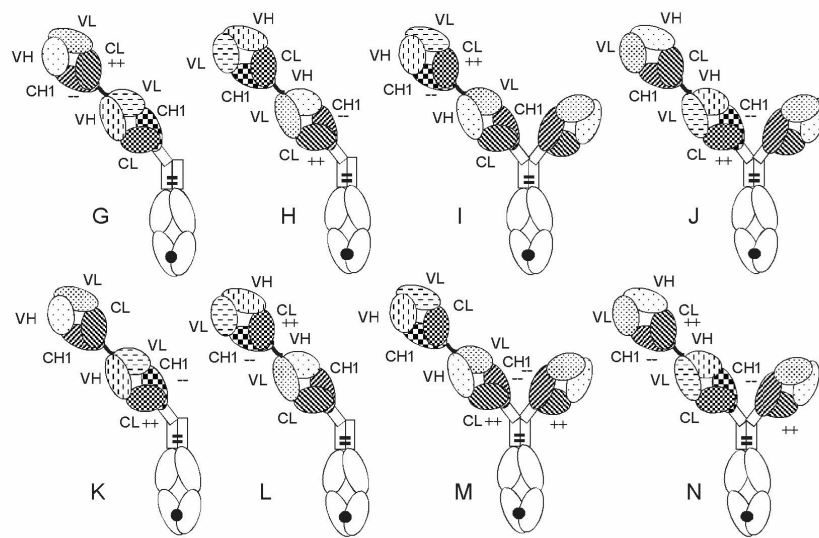
Фиг. 10



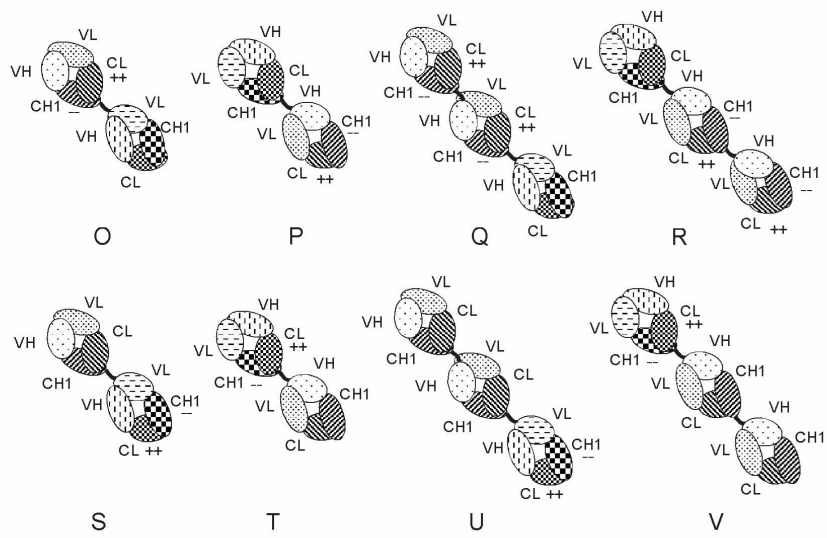
Фиг. 11



Фиг. 11



Фиг. 11



Фиг. 11

