

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090387 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.21

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.31

(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И FLT3

(31) 62/539,421

(32) 2017.07.31

(33) US

(86) PCT/US2018/044610

(87) WO 2019/028027 2019.02.07

(71) Заявитель:
ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

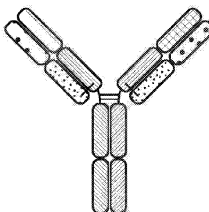
(72) Изобретатель:

Чан Грегори П., Чэунг Энн Ф., Хани
Уилльям, Ланд Бредли М., Принц
Бьянка (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны мультиспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор NKG2D, CD16, и опухолеассоциированный антиген FLT3, а также фармацевтические композиции и терапевтические способы, пригодные для лечения рака.



A1

202090387

202090387

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561258EA/060

БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И FLT3

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/539421, поданной 31 июля 2017 г., содержание которой настоящим включено посредством ссылки в полном объеме во всех отношениях.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[02] Данная заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки в полном объеме. Указанный текст в формате ASCII, созданный 30 июля 2018 г., называется DFY-027WO_SL.txt и имеет размер 103731 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[03] Данное изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с NKG2D, CD16 и опухолеассоциированным антигеном FLT3.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Рак продолжает оставаться значительной медицинской проблемой, несмотря на большой объем исследований и научных достижений, описанных в литературе, посвященной лечению этого заболевания. Раки крови и костного мозга являются часто диагностируемыми типами рака, включая множественные миеломы, лейкоз и лимфомы. Современные варианты лечения этих видов рака не являются эффективными для всех пациентов и/или могут иметь существенные нежелательные побочные эффекты. Другие типы рака также остаются сложными для лечения с использованием существующих вариантов терапии.

[05] Противораковые иммунотерапии являются желательными из-за их высокой специфичности и способности облегчать разрушение раковых клеток с использованием иммунной системы самого пациента. Гибридные белки, такие как биспецифические Т-клеточные рекрутеры, представляют собой противораковые иммунотерапии, описанные в литературе, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками, способствуя разрушению опухолевых клеток. Антитела, связывающиеся с определенными опухолеассоциированными антигенами и с определенными иммунными клетками, были описаны в литературе. См., например, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

[06] Естественные клетки-киллеры (ЕК - NK - natural killer cells) представляют собой компонент врожденной иммунной системы и составляют приблизительно 15% циркулирующих лимфоцитов. ЕК-клетки инфильтрируют практически во все ткани и были первоначально охарактеризованы по их способности эффективно уничтожать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсibilизации. Активированные ЕК-клетки уничтожают клетки-мишени с помощью средств, аналогичных цитотоксическим Т-клеткам - т.е., с помощью цитолитических гранул, которые содержат перфорин и гранзимы, а также посредством путей рецепторов смерти.

Активированные ЕК-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN- γ , и хемокины, которые промотируют рекрутмент других лейкоцитов в ткань-мишень.

[07] ЕК-клетки реагируют на сигналы с помощью различных активирующих и ингибирующих рецепторов на своей поверхности. Например, когда ЕК-клетки встречаются здоровые аутологичные клетки, их активность ингибируется путем активации иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KIR - killer-cell immunoglobulin-like receptor). Альтернативно, когда ЕК-клетки встречаются чужеродные клетки или раковые клетки, они активируются с помощью их активирующих рецепторов (например, NKG2D, NCR, DNAM1). ЕК-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на их поверхности. Общая чувствительность ЕК-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов.

[08] FMS-подобная тирозинкиназа-3 (FLT3), представляющая собой рецептор тирозинкиназы, экспрессируемый в плюрипотентных клетках-предшественниках и общих лимфоидных предшественниках, важна для развития гематопоетической и иммунной систем. Сигнализация посредством FLT3 играет важную роль в выживании клеток, пролиферации и дифференциации. Мутации рецептора FLT3 могут приводить к развитию лейкоза, например, острого миелоидного лейкоза, Т-клеточного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, и волосатоклеточного лейкоза. Внутренние tandemные дубликации FLT3 (FLT3-ITD) являются наиболее распространенными мутациями, связанными с острым миелогенным лейкозом (ОМЛ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[09] Данное изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированным антигеном FLT3. Такие белки могут связываться с несколькими видами ЕК-активирующих рецепторов, и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В определенных вариантах реализации, эти белки могут агонизировать ЕК-клетки у людей. В некоторых вариантах реализации, эти белки могут агонизировать ЕК-клетки у человека и у других видов, таких как грызуны и яванский макак. Различные аспекты и варианты реализации изобретения описаны более подробно ниже.

[010] Соответственно, один аспект изобретения предлагает белок, включающий первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает опухолеассоциированный антиген FLT3; и Fc-домен антитела, его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16.

[011] Антигенсвязывающие сайты могут каждый включать переменный домен тяжелой цепи антитела и переменный домен легкой цепи антитела (например, расположенные, как в антителе, или слитые вместе с образованием (to from) scFv), или один или несколько антигенсвязывающих сайтов могут быть однодоменным антителом,

таким как V_HН-антитело, такое как антитело верблюдовых, или V_{NAR}-антитело, такое как присутствующее у хрящевых рыб.

[012] В одном аспекте, данное изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированным антигеном FLT3. NKG2D-связывающий сайт включает переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 и SEQ ID NO:93.

[013] Первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, в некоторых вариантах реализации, может включать переменный домен тяжелой цепи, родственник SEQ ID NO:1, такой как имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичную SEQ ID NO:1, и/или включающий аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:105), CDR2 (SEQ ID NO:106), и CDR3 (SEQ ID NO:107) SEQ ID NO:1. Переменный домен тяжелой цепи, родственник SEQ ID NO:1, может быть связан с различными переменными доменами легкой цепи с образованием NKG2D-связывающего сайта. Например, первый антигенсвязывающий сайт, который включает переменный домен тяжелой цепи, родственник SEQ ID NO:1, может дополнительно включать переменный домен легкой цепи, выбранный из любой из последовательностей, родственных SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 и 40. Например, первый антигенсвязывающий сайт включает переменный домен тяжелой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичными SEQ ID NO:1, и переменный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичными любой из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 и 40.

[014] Альтернативно, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственник SEQ ID NO:41, и переменный домен легкой цепи, родственник SEQ ID NO:42. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:41, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:44), и CDR3 (SEQ ID NO:45) SEQ ID NO:41. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:42, и/или

включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:47), и CDR3 (SEQ ID NO:48) SEQ ID NO:42.

[015] В других вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:49, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:50. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:49, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:52), и CDR3 (SEQ ID NO:53) SEQ ID NO:49. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:50, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:55), и CDR3 (SEQ ID NO:56) SEQ ID NO:50.

[016] Альтернативно, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:57, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:58, такие как имеющие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:57, и по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:58, соответственно.

[017] В другом варианте реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:59, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:60. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:59, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:134), CDR2 (SEQ ID NO:135), и CDR3 (SEQ ID NO:136) SEQ ID NO:59. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:60, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:137), CDR2 (SEQ ID NO:138), и CDR3 (SEQ ID NO:139) SEQ ID NO:60.

[018] Первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, в некоторых вариантах реализации, может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:61, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:62. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:61, и/или включать

аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64), и CDR3 (SEQ ID NO:65) SEQ ID NO:61. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:62, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:66), CDR2 (SEQ ID NO:67), и CDR3 (SEQ ID NO:68) SEQ ID NO:62. В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:69, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:70. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:69, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:72), и CDR3 (SEQ ID NO:73) SEQ ID NO:69. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:70, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:75), и CDR3 (SEQ ID NO:76) SEQ ID NO:70.

[019] В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:77, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:78. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:77, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:80), и CDR3 (SEQ ID NO:81) SEQ ID NO:77. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:78, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:82), CDR2 (SEQ ID NO:83), и CDR3 (SEQ ID NO:84) SEQ ID NO:78.

[020] В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:85, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:86. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:85, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:87), CDR2 (SEQ ID NO:88), и CDR3 (SEQ ID NO:89) SEQ ID NO:85. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:86, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:90), CDR2 (SEQ ID NO:91), и CDR3 (SEQ ID NO:92) SEQ ID NO:86.

[021] В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:93, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:94. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:93, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95), CDR2 (SEQ ID NO:96), и CDR3 (SEQ ID NO:97) SEQ ID NO:93. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:94, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:98), CDR2 (SEQ ID NO:99), и CDR3 (SEQ ID NO:100) SEQ ID NO:94.

[022] В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:101, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:102, такие как имеющие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:101, и по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:102, соответственно. В некоторых вариантах реализации, первый антигенсвязывающий сайт может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:103, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:104, такие как имеющие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:103, и по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичные SEQ ID NO:104, соответственно.

[023] В некоторых вариантах реализации, второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с FLT3, может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:109, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:113. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:109, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:110), CDR2 (SEQ ID NO:111), и CDR3 (SEQ ID NO:112) SEQ ID NO:109. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:113, и/или включать аминокислотные последовательности,

идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:114), CDR2 (SEQ ID NO:115), и CDR3 (SEQ ID NO:116) SEQ ID NO:113.

[024] Альтернативно, второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с FLT3, может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:117, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:121. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:117, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:118), CDR2 (SEQ ID NO:119), и CDR3 (SEQ ID NO:120) SEQ ID NO:117. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:121, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:122), CDR2 (SEQ ID NO:123), и CDR3 (SEQ ID NO:124) SEQ ID NO:121.

[025] Альтернативно, второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с FLT3, может включать переменный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:125, и переменный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:129. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:125, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:126), CDR2 (SEQ ID NO:127), и CDR3 (SEQ ID NO:128) SEQ ID NO:125. Аналогично, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичным SEQ ID NO:129, и/или включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:130), CDR2 (SEQ ID NO:131), и CDR3 (SEQ ID NO:132) SEQ ID NO:129.

[026] В некоторых вариантах реализации, второй антигенсвязывающий сайт включает переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности переменного домена легкой цепи, присутствующей в первом антигенсвязывающем сайте.

[027] В некоторых вариантах реализации, белок включает часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, причем Fc-домен антитела включает шарнирный и CH2-домены, и/или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные аминокислотной последовательности 234-332 антитела IgG человека.

[028] Также предлагаются композиции, содержащие любой из белков, описанных в данном документе; клетки, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот, экспрессирующих указанные белки, и способы усиления клеточной гибели с использованием таких белков.

[029] Другой аспект изобретения предусматривает способ лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества мультиспецифических связывающих белков, описанных в данном документе. Типичные примеры видов рака, лечение которых может проводиться с использованием мультиспецифических связывающих белков, включают лейкоз, например, острый миелолейкоз, Т-клеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз и волосатоклеточный лейкоз.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[030] **Фиг. 1** изображает гетеродимерное мультиспецифическое антитело. Каждое плечо может представлять собой или NKG2D-связывающий домен, или FLT3-связывающий домен. В некоторых вариантах реализации, NKG2D- и FLT3- связывающие домены могут иметь общую легкую цепь.

[031] **Фиг. 2** изображает гетеродимерное мультиспецифическое антитело. NKG2D-связывающий домен или FLT3-связывающий домен могут иметь формат scFv (правое плечо).

[032] **Фиг. 3** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с человеческим рекомбинантным NKG2D в ИФА-анализе.

[033] **Фиг. 4** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с рекомбинантным NKG2D яванского макака в ИФА-анализе.

[034] **Фиг. 5** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с рекомбинантным NKG2D мыши в ИФА-анализе.

[035] **Фиг. 6** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие связывание NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с EL4-клетками, экспрессирующими человеческий NKG2D, определенное методом проточной цитометрии, указывающие кратность превышения фонового значения (FOB) средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

[036] **Фиг. 7** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие связывание NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с EL4-клетками, экспрессирующими мышинный NKG2D, определенное методом проточной цитометрии, указывающие кратность превышения фонового значения (FOB) средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

[037] **Фиг. 8** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность специфического связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с рекомбинантным человеческим NKG2D-Fc, определенную путем конкуренции с природным лигандом ULBP-6.

[038] **Фиг. 9** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность специфического связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как

клоны) с рекомбинантным человеческим NKG2D-Fc, определенную путем конкуренции с природным лигандом MICA.

[039] **Фиг. 10** представляет собой линейные графики, демонстрирующие аффинность специфического связывания NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) с рекомбинантным мышинным NKG2D-Fc, определенную путем конкуренции с природным лигандом Rae-1 дельта.

[040] **Фиг. 11** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию человеческого NKG2D NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны) путем определения величины процентного содержания положительных по ФНО- α клеток, которые экспрессируют гибридные белки человеческий NKG2D-CD3-дзета.

[041] **Фиг. 12** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию мышинового NKG2D NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны) путем определения величины процентного содержания положительных по ФНО- α клеток, которые экспрессируют гибридные белки мышинный NKG2D-CD3-дзета.

[042] **Фиг. 13** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию человеческих ЕК-клеток NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны).

[043] **Фиг. 14** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию человеческих ЕК-клеток NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны).

[044] **Фиг. 15** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию мышинных ЕК-клеток NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны).

[045] **Фиг. 16** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие активацию мышинных ЕК-клеток NKG2D-связывающими доменами (указаны как клоны).

[046] **Фиг. 17** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие цитотоксический эффект NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны) на опухолевые клетки.

[047] **Фиг. 18** представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие температуру плавления NKG2D-связывающих доменов (указаны как клоны), измеренную методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.

[048] **Фиг. 19А-19С** представляют собой столбчатые диаграммы синергической активации ЕК-клеток с использованием связывания CD16 и NKG2D. Фиг. 19А демонстрирует уровни CD107а; Фиг. 19В демонстрирует уровни IFN- γ ; Фиг. 19С демонстрирует уровни CD107а и IFN- γ . На графиках приведены средние значения ($n=2$) $\pm$ SD (стандартное отклонение). Данные представляют пять независимых экспериментов с пятью разными здоровыми донорами.

[049] **Фиг. 20** изображает TriNKET (терапии триспецифическими рекрутерами ЕК-клеток (Tri-specific, NK cell Engager Therapies)) в форме Triomab, которая представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух половин антитела, каждая с одной легкой и одной

тяжелой цепями, полученными из двух исходных антител. Форма Triomab может быть гетеродимерным конструктором, содержащим 1/2 антитела крысы и 1/2 антитела мыши.

[050] **Фиг. 21** изображает TriNKET в форме KiH с общей легкой цепью, которая использует технологию knobs-into-holes (КИН, "выступы-во-отверстия"). KiH представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. TriNKET в формате KiH может быть гетеродимерным конструктором с 2 Fab, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащими две разные тяжелые цепи и общую легкую цепь, которая спаривается с обоими тяжелыми цепями.

[051] **Фиг. 22** изображает TriNKET в форме иммуноглобулина с двойным переменным доменом (DVD-IgTM), в которой связывающиеся с мишенями домены двух моноклональных антител соединены гибкими природными линкерами с образованием тетравалентной IgG-подобной молекулы. DVD-IgTM представляет собой гомодимерный конструктор, в котором переменный домен, специфический к антигену 2, слит с N-концом переменного домена Fab, специфического к антигену 1. Форма DVD-IgTM содержит нормальный Fc.

[052] **Фиг. 23** изображает TriNKET в форме ортогонального интерфейса Fab (Ortho-Fab), которая представляет собой гетеродимерный конструктор, содержащий 2 Fab, связывающиеся с мишенью 1 и мишенью 2, слитые с Fc. Спаривание легкая цепь (LC)-тяжелая цепь (HC) обеспечивается посредством ортогонального интерфейса. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[053] **Фиг. 24** изображает TriNKET в формате Ig 2-в-1 (2-in-1).

[054] **Фиг. 25** изображает TriNKET в форме ES, которая является гетеродимерным конструктором, содержащим два разных Fab, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатически направляемыми мутациями в Fc.

[055] **Фиг. 26** изображает TriNKET в форме обмена Fab-фрагментами (Fab Arm Exchange): антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем взаимного обмена тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекула) на пару тяжелая-легкая цепь из другой молекулы, с образованием биспецифических антител. Форма с обменом Fab-фрагментами (сFae) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный посредством мутаций гетеродимеризации.

[056] **Фиг. 27** изображает TriNKET в форме SEED Body (доменное антитело с заменой нитей), которая представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации.

[057] **Фиг. 28** изображает TriNKET в форме LuZ-Y, в которой "лейциновая молния" используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC (тяжелых цепей). Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий два разных scFab (одноцепочечных Fab), связывающихся с мишенями 1 и 2, слитых с Fc.

Гетеродимеризация обеспечивается посредством мотивов лейциновой молнии, слитых с С-концом Fc.

[058] **Фиг. 29** изображает TriNKET в форме Cov-X-Body.

[059] **Фиг. 30А-30В** изображают TriNKET в форме $\kappa\lambda$ -Body, которые являются гетеродимерными конструктами с двумя разными Fab, слитыми с Fc, стабилизированным мутациями гетеродимеризации: один Fab, специфический к антигену 1, содержит каппа-LC (легкую цепь каппа), и второй Fab, специфический к антигену 2, содержит лямбда-LC (легкую цепь лямбда). **Фиг. 30А** показывает типичный пример одной формы $\kappa\lambda$ -Body; **Фиг. 30В** показывает типичный пример другого $\kappa\lambda$ -Body.

[060] **Фиг. 31** изображает гетеродимерный конструкт Oasc-Fab (одноцепочечный Fab с одним плечом (one-arm single chain Fab)), который включает Fab, связывающийся с мишенью 1, и scFab (одноцепочечный Fab), связывающийся с мишенью 2, оба слитые с Fc-доменом. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc-домене.

[061] **Фиг. 32** изображает DuetMab, который представляет собой конструкт, содержащий два разных Fab, связывающихся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат различающиеся мостиковые связи S-S, которые обеспечивают правильность спаривания легкой цепи и тяжелой цепи.

[062] **Фиг. 33** изображает CrossmAb, который представляет собой гетеродимерный конструкт с двумя разными Fab, связывающимися с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. CL- и CH1-домены, и VH- и VL-домены перегруппированы (are switched), например, CH1 слит последовательно (in-line) с VL, а CL слит последовательно с VH.

[063] **Фиг. 34** изображает Fit-Ig, представляющий собой гомодимерный конструкт, в котором Fab, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC, принадлежащим Fab, который связывается с антигеном 1. Этот конструкт содержит Fc дикого типа.

[064] **Фиг. 35** представляют собой линейные графики, демонстрирующие связывание специфических к FLT3 TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на EL4-клетках. Моноклональное антитело IMCEB10 против FLT3 было использовано в качестве контроля.

[065] **Фиг. 36А и 36В** представляют собой линейные графики, демонстрирующие связывание специфических к FLT3 TriNKET с FLT3, экспрессируемым на клеточных линиях острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) человека Molm-13 (**Фиг. 36А**) и EOL-1 (**Фиг. 36В**). Моноклональное антитело IMCEB10 против FLT3 было использовано в качестве контроля.

[066] **Фиг. 37А и 37В** представляют собой линейные графики, демонстрирующие интернализацию специфических к FLT3 TriNKET на клетках EOL-1 (**Фиг. 37А**) и клетках Molm-13 (**Фиг. 37В**) после 2 часов и 20 часов инкубации при 37 °C. Линтузумаб был использован в качестве контроля.

[067] **Фиг. 38А и 38В** представляют собой линейные графики, демонстрирующие опосредованную TriNKET цитотоксичность человеческих ЕК-клеток по отношению к

экспрессирующим FLT3 клеткам EOL-1. Моноклональное антитело IMCEB10 против FLT3 и TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен, выделенный из IMCEB10, представлены на Фиг. 38А. Моноклональное антитело 4G8 против FLT3 и TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен, выделенный из 4G8, представлены на Фиг. 38В.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[068] Данное изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированный антиген FLT3. В некоторых вариантах реализации, мультиспецифические белки дополнительно включают дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3 или другой опухолеассоциированный антиген. Данное изобретение также предлагает фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы с использованием таких мультиспецифических белков и фармацевтических композиций в таких целях, как лечение рака. Различные аспекты изобретения описаны в изложенных ниже разделах; однако, аспекты изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не ограничены каким-либо конкретным разделом.

[069] Для облегчения понимания данного изобретения ниже приведены определения ряда терминов и выражений.

[070] Термины в единственном числе (в английском тексте - с артиклями “a” и “an”), в используемом в данном документе значении, означают “один или несколько” и включают множественное число, если это не противоречит контексту.

[071] В используемом в данном документе значении, термин “антигенсвязывающий сайт” относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В человеческих антителах, антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых переменных (“V”) областей тяжелой (“H”) и легкой (“L”) цепей. Три сильно дивергирующих (divergent) участка в V-областях тяжелой и легкой цепей называются “гипервариабельными участками”, которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как “каркасные участки”, или “FR”. Таким образом, термин “каркасный участок” (FR) относится к аминокислотным последовательностям, которые обычно расположены между и прилегают к гипервариабельным участкам иммуноглобулинов. В молекуле человеческого антитела, три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи расположены друг относительно друга в трехмерном пространстве таким образом, чтобы образовывалась антигенсвязывающая поверхность. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной к трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельных участка каждой тяжелой и легкой цепи называются “участками, определяющими комплементарность”, или “CDR”. У некоторых животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий сайт состоит из одной цепи антитела, образующей “однодоменное антитело”. Антигенсвязывающие сайты могут существовать в интактном антителе, в

антигенсвязывающем фрагменте антитела, сохраняющем антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, использующем пептидный линкер для связывания вариабельного домена тяжелой цепи с вариабельным доменом легкой цепи в единый полипептид.

[072] Термин “опухолеассоциированный антиген” в используемом в данном документе значении означает любой антиген, включая, без ограничений, белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, связанный с раковым заболеванием. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например, на ассоциированных с опухолью кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме, или иммунных инфильтратах.

[073] В используемом в данном документе значении, термины “субъект” и “пациент” относятся к организму, получающему лечение способами и композициями, описанными в данном документе. Такие организмы предпочтительно включают, без ограничений, млекопитающих (например, мышинных, обезьян, лошадиных, бычьих, свиней, псовых, кошачьих и т.п.) и более предпочтительно, включают людей.

[074] В используемом в данном документе значении, термин “эффективное количество” относится к количеству соединения (например, соединения по данному изобретению), достаточному для получения благоприятных или желательных результатов. Эффективное количество может быть введено в один или несколько приемов, применений или дозировок и не должно ограничиваться конкретной рецептурой композиции или путем введения. В используемом в данном документе значении, термин “лечение” включает любой эффект, например, уменьшение, снижение, модулирование, ослабление интенсивности или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п., или снижению интенсивности его симптома.

[075] В используемом в данном документе значении, термин “фармацевтическая композиция” относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно пригодной для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

[076] В используемом в данном документе значении, термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к любым стандартным фармацевтическим носителям, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии типа масло/вода или вода/масло), и различные типы смачивающих агентов. Композиции могут также включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов приведены, например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[077] В используемом в данном документе значении, термин “фармацевтически приемлемая соль” относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислоты или основания) соединения по данному изобретению, которая, при введении субъекту, способна обеспечивать соединение по данному изобретению или его активный метаболит или остаток. Как известно специалистам в данной области техники, “соли”

соединений по данному изобретению может быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Типичные примеры кислот включают, без ограничений, хлористоводородную, бромистоводородную, серную, азотную, перхлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-п-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т.п. Другие кислоты, такие как щавелевая, хотя сами не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы в приготовлении солей, пригодных для использования в качестве промежуточных при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

[078] Типичные примеры оснований включают, без ограничений, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например, магния), аммиак, и соединения формулы NW_4^+ , где W обозначает C_{1-4} -алкил, и т.п.

[079] Типичные примеры солей включают, без ограничений: ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат (flucoheptanoate), глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканат, и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений по данному изобретению, связанные с пригодным катионом, таким как Na^+ , NH_4^+ и NW_4^+ (где W обозначает C_{1-4} -алкильную группу), и т.п.

[080] Для терапевтического применения предусматриваются фармацевтически приемлемые соли соединений по данному изобретению. Однако, соли кислот и оснований, не являющиеся фармацевтически приемлемыми, могут также находить применение, например, в получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

[081] В данном описании, в тех случаях, когда композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или когда процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии, предусматривается, что, дополнительно, существуют композиции по данному изобретению, которые состоят по существу из, или состоят из, перечисленных компонентов, и существуют процессы и способы в соответствии с данным изобретением, которые состоят по существу из, или состоят из, перечисленных технологических стадий.

[082] Как правило, для композиций с указанием процентного содержания проценты являются весовыми, если не указано иное. Дополнительно, если упоминание переменной не сопровождается определением, то действительным является предшествующее определение переменной.

I. БЕЛКИ

[083] Данное изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и опухолеассоциированным антигеном FLT3. Мультиспецифические связывающие белки пригодны для использования в фармацевтических композициях и терапевтических способах, описанных в данном документе. Связывание мультиспецифических связывающих белков с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественной клетке-киллере усиливает активность естественной клетки-киллера по разрушению опухолевых клеток, экспрессирующих FLT3. Связывание мультиспецифических связывающих белков с FLT3-экспрессирующими клетками приводит к сближению раковых клеток с естественной клеткой-киллером, что способствует прямому и опосредованному разрушению раковых клеток естественной клеткой-киллером. Дополнительное описание некоторых типичных примеров мультиспецифических связывающих белков приведено ниже.

[084] Первый компонент мультиспецифических связывающих белков связывается с рецептором NKG2D-экспрессирующих клеток, которые могут включать, без ограничений, ЕК-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и $CD8^+ \alpha\beta$ Т-клетки. После связывания с NKG2D, мультиспецифические связывающие белки могут блокировать связывание с NKG2D природных лигандов, таких как ULBP6 и MICA, и активацию рецепторов NKG2D.

[085] Второй компонент мультиспецифических связывающих белков связывает FLT3. Экспрессирующие FLT3 клетки могут присутствовать при лейкозе, например, остром миелоидном лейкозе и Т-клеточном лейкозе.

[086] Третий компонент мультиспецифических связывающих белков связывается с клетками, экспрессирующими CD16, представляющий собой Fc-рецептор на поверхности лейкоцитов, включая естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

[087] Мультиспецифические связывающие белки, описанные в данном документе, могут находиться в различных форматах. Например, одним из форматов является гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, первую легкую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую легкую цепь иммуноглобулина (Фиг. 1). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), первый переменный домен тяжелой цепи и, необязательно, первый CH1-домен тяжелой цепи. Первая легкая цепь иммуноглобулина включает первый переменный домен легкой цепи и первый константный домен легкой цепи. Первая легкая цепь иммуноглобулина, вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина, образует антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), второй переменный домен тяжелой цепи и, необязательно, второй CH1-домен тяжелой цепи. Вторая легкая цепь иммуноглобулина включает второй переменный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи. Вторая легкая

цепь иммуноглобулина, вместе со второй тяжелой цепью иммуноглобулина, образует антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (Фиг. 1). В некоторых вариантах реализации, первая легкая цепь иммуноглобулина идентична второй легкой цепи иммуноглобулина.

[088] Другой типичный пример формата предусматривает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина (Фиг. 2). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый посредством линкера или шарнира антитела с одноцепочечным переменным фрагментом (scFv), состоящим из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, которые спариваются и связывают NKG2D, или связывают антиген FLT3. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), второй переменный домен тяжелой цепи и, необязательно, CH1-домен тяжелой цепи. Легкая цепь иммуноглобулина включает переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина спаривается с легкой цепью иммуноглобулина и связывается с NKG2D или связывает опухлеассоциированный антиген FLT3. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе способны связываться с CD16 (Фиг. 2).

[089] Один или несколько дополнительных связывающих мотивов могут быть слиты с С-концом CH3-домена константной области, необязательно, через линкерную последовательность. В определенных вариантах реализации, антигенсвязывающий мотив представляет собой одноцепочечную или стабилизированную дисульфидными связями переменную область (scFv), образующую тетравалентную или трехвалентную молекулу.

[090] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме Triomab, которая представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух половин антитела, каждая с одной легкой и одной тяжелой цепью, полученных из двух исходных антител.

[091] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме KiH с общей легкой цепью (LC), которая использует технологию "выступы-во-отверстия" (knobs-into-holes, KiH). KiH предусматривает модифицирование CH3-доменов для создания в каждой тяжелой цепи "выступа" (knob) или "отверстия" (hole) для промотирования гетеродимеризации. Идеей, легшей в основу технологии Fc "выступы-во-отверстия" (KiH), было введение "выступа" в один CH3-домен (CH3A) путем замены остатка малого размера на объемный (например, T366W_{CH3A} по системе нумерации EU). Для размещения "выступа", комплементарную поверхность "отверстия" создавали на другом CH3-домene (CH3B) путем замены ближайших соседних к выступу остатков на меньшие по размеру (например, T366S/L368A/Y407V_{CH3B}). Мутацию "отверстия" оптимизировали путем скрининга структурно-направляемой фаговой библиотеки (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., Stable heterodimers from remodeling

the domain interface of a homodimer using a phage display library, *J. Mol. Biol.* (1997) 270(1):26-35). Рентгеновские кристаллические структуры вариантов KiH Fc (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, et al., Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J. Mol. Biol.* (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.* (2014) 58(1):132-8) продемонстрировали, что гетеродимеризации термодинамически благоприятствуют гидрофобные взаимодействия, обусловленные стерической комплементарностью на поверхности раздела между сердцевинами CH3-доменов, в то время как поверхности раздела выступ-выступ и отверстие-отверстие не благоприятствуют гомодимеризации из-за стерических препятствий и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

[092] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме иммуноглобулина с двойным варибельным доменом (DVD-Ig™), которая объединяет связывающие мишени домены двух моноклональных антител посредством гибких природных линкеров, и образует тетравалентную IgG-подобную молекулу.

[093] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме Fab с ортогональным интерфейсом (Ortho-Fab). В соответствии с подходом орто-Fab IgG (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, et al., Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2):191-8), используют структурное конструирование участков (structure-based regional design) для введения комплементарных мутаций на поверхности раздела LC и HC_{VH-CH1} только в одном Fab, без внесения каких-либо изменений в другой Fab.

[094] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в формате 2-в-1 Ig. В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме ES, которая представляет собой гетеродимерный конструктор, содержащий два разных Fab, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатически направляемыми мутациями в Fc.

[095] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме κλ-Body, которая представляет собой гетеродимерный конструктор с двумя разными Fab, слитыми с Fc, стабилизированным мутациями гетеродимеризации: Fab1, специфический к антигену 1, содержит каппа-LC, в то время как второй Fab, специфический к антигену 2, содержит лямбда-LC. На Фиг. 30А приведено примерное представление одной формы κλ-Body; на Фиг. 30В приведено примерное представление другого κλ-Body.

[096] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме с обменом Fab-фрагментами (антитела, обменивающиеся Fab-

фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекула) на пару тяжелая-легкая цепи другой молекулы, с образованием биспецифического антитела).

[097] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме SEED Body. Платформа домена, модифицированного заменой нитей (strand-exchange engineered, SEED) была разработана для получения асимметричных и биспецифических антителоподобных молекул, которые создают возможность расширения терапевтического применения природных антител. Такая платформа модифицированного белка основана на обмене структурно родственными последовательностями иммуноглобулина в консервативных CH3-доменах. Разработка SEED позволяет эффективно генерировать гетеродимеры AG/GA, в то же время создавая неблагоприятные условия для гомодимеризации AG и GA SEED CH3-доменов. (Muda M. et al., Protein Eng. Des. Sel. (2011, 24(5):447-54)).

[098] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме LuZ-Y, в которой лейциновая молния используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC (Wranik, BJ. et al., J. Biol. Chem. (2012), 287:43331-9).

[099] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме Cov-X-Body. В биспецифических CovX-Bodies, два разных пептида соединены вместе с использованием разветвленного азетидинового линкера и слиты с каркасным (scaffold) антителом в мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры ответственны за функциональные активности, каркас антитела обеспечивает длительный период полувыведения и Ig-подобное распределение. Фармакофоры могут быть химически оптимизированы или заменены на другие фармакофоры для получения оптимизированных или уникальных биспецифических антител (Dorpalapudi VR et al., PNAS (2010), 107(52);22611-22616).

[0100] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в гетеродимерной форме Oasc-Fab, которая включает Fab, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[0101] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме DuetMab, которая представляет собой гетеродимерный конструктор, содержащий два разных Fab, связывающихся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат различающиеся мостиковые связи S-S, которые обеспечивают правильность спаривания LC и HC.

[0102] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерный конструктор с двумя разными Fab, связывающимися с мишенями 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированным путем гетеродимеризации. CL- и CH1-домены и VH- и VL-домены

перегруппированы (switched), например, CH1 слит последовательно с VL, а CL слит последовательно с VH.

[0103] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифический связывающий белок находится в форме Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерный конструктор, в котором Fab, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC, принадлежащего Fab, который связывается с антигеном 1. Конструктор содержит Fc дикого типа.

[0104] В Таблице 1 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые, в комбинации, могут связываться с NKG2D. Связывающие NKG2D домены могут различаться по своей аффинности связывания с NKG2D, тем не менее, все они активируют человеческие NKG2D и ЕК-клетки.

Таблица 1		
Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:105) - GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:106) - EIDHSGSTNYPNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:107) - ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYP ITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPDDFATYYCQQYHSF

	SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)	YTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPDDEFATYYCQQSNSY YTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISLQPDDEFATYYCQQYNSYP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITTCR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDSATYYCQQSYDIP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISLQPDDEFATYYCQQYGSFP ITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPDDEFATYYCQQSKEVP WTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF

	FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17)	TLTISSLQPDDFATYYCQQYNSFP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPDDFATYYCQQYDIY PTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYDSYP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYGSFP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYQSFP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYSSFS TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL

	DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDFFATYYCQQYESYS TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDFFATYYCQQYDSFI TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDFFATYYCQQYQSYF TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPDFFATYYCQQYHSF PTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPDFFATYYCQQYELY SYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDFFATYYCQQYDTFI TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

	GGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARGDSSIR HAYYYYGMDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 (SEQ ID NO:43) - GTFSSY AIS CDR2 (SEQ ID NO:44) - GIIPFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:45) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV	KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYSTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42) CDR1 (SEQ ID NO:46) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:47) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:48) - QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRFH PYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:51) - GSISSSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO:52) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:53) - ARGSDRFHPYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLPEPDAFVYYCQQFDTW PPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50) CDR1 (SEQ ID NO:54) - RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:55) - DASN RAT CDR3 (SEQ ID NO:56) - QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCEQYDSYP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAS GGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARRGRKA SGSFYYYYGMDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:59)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCE SSQSLN SGNQKNYLTWYQQKP GQPPKPLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQNDYSYPYTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO:60)

	CDR1 (SEQ ID NO:134) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:135) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:136) - ARRGRKASGSFYYYGMDV	CDR1 (SEQ ID NO:137) - ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:138) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:139) - QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYAQKFQGRTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARGAP NYGDTTHDYYMDVWGKGTTVTVS S (SEQ ID NO:61) CDR1 (SEQ ID NO:63) - YTFTSYMH CDR2 (SEQ ID NO:64) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) - ARGAPNYGDTTHDYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDD WPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QQYDDWPFT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQGRTMTRD TSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARD TGEYYDTDDHGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:69) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTGYMH CDR2 (SEQ ID NO:72) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:73) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDY WPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70) CDR1 (SEQ ID NO:74) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:75) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:76) - QQDDYWPPT
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGG	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSY

	YYDSGAGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:77) CDR1 (SEQ ID NO:79) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:81) - AKDGGYYDSGAGDY	PRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:82) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:83) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:84) - QQGVSYPR
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSL YLQMNSLR AEDTAVYYCARGAPMG AAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYSMN CDR2 (SEQ ID NO:88) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:89) - ARGAPMGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQGVSF PRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:90) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:91) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:92) - QQGVSPRT
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYAQKFQGRTMTRDTS TSTVYME LSSLRSEDTAVYYCAREG AGFAYGMDYYYMDVWGKGTTVTV SS (SEQ ID NO:93) CDR1 (SEQ ID NO:95) - YTFTSYMH CDR2 (SEQ ID NO:96) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:97) - AREGAGFAYGMDYYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFAVYYCQQSDN WPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:98) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:99) - DASN RAT CDR3 (SEQ ID NO:100) - QQSDNWPFT

[0105] Альтернативно, варибельный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO:101, может быть спарен с варибельным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO:102, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как показано в US 9273136.

SEQ ID NO:101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPL
SGVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0106] Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO:103, может быть спарен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO:104, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как показано в US 7879985.

SEQ ID NO:103

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS
ANYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTS
S

SEQ ID NO:104

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0107] В одном аспекте, данное изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах, и антигеном FLT3. В Таблице 2 перечислены некоторые типичные примеры последовательностей переменного домена тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые, в комбинации, могут связываться с FLT3.

Таблица 2		
Клоны	Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи
анти-FLT3 (IMCEB10) (патент США № 8071099)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYMHWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RGVGAHDAFDIWGQGTTVTVSSA (SEQ ID NO:109) CDR1 (SEQ ID NO:110) - GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:111) - NPSGGS CDR3 (SEQ ID NO:112) - GVGAHDAFDI	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCRSSQSLLSHNGNNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSRNASG VPDRFGSGSGSDTDFTLQISRV EAEDVGVYYCMQGTHPAISF GQGRLEIKR (SEQ ID NO:113) CDR1(SEQ ID NO:114) - QSLLSHNGNNYLD CDR2 (SEQ ID NO:115) -

		LGSNRAS CDR3 (SEQ ID NO:116) - MQGTHPAIS
анти-FLT3 (4G8) (патент США № 9023996)	QVQLQQPGAELVKPGASLKLCKSS GYTFTSYWMHWVRQRPBGHGLEWI GEIDPSDSYKDYNQKFKDKATLTV DRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYC ARAITTTPDFDFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:117) CDR1 (SEQ ID NO:118) - SYWMH CDR2 (SEQ ID NO:119) - EIDPSDSYKDYNQKFKD CDR3 (SEQ ID NO:120) - AITTPDFD	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSL CRASQSSISNNLHWYQQKSHE SPRLLIKYASQSSISGIPSRFSGS GSGTDFTLSINSVETEDFGVY FCQQSNTWPYTFGGGKLEIK R (SEQ ID NO:121) CDR1 (SEQ ID NO:122) - RASQSSISNNLH CDR2 (SEQ ID NO:123) - YASQSSIS CDR3 (SEQ ID NO:124) - QQSNTWPYT
анти-FLT3 (BV10) (патент США № 9023996)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVS GFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSK SQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKG GIYYANHYYAMDYWGQGTSTVTS S (SEQ ID NO:125) CDR1 (SEQ ID NO:126) - NYGLH CDR2 (SEQ ID NO:127) - VIWSGGSTDYNAAFIS CDR3 (SEQ ID NO:128) - KGGIYYANHYYAMDY	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTM SCKSSQSLNLSGNQKNYMA YQQKPGQPPKLLIYGASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCQNDHSYPLTFG AGTKLELKR (SEQ ID NO:129) CDR1 (SEQ ID NO:130) - KSSQSLNLSGNQKNYMA CDR2 (SEQ ID NO:131) - GASTRES CDR3 (SEQ ID NO:132) - QNDHSYPLT

[0108] Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, способные связываться с FLT3, могут быть идентифицированы путем скрининга на связывание аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO:133.

SEQ ID NO:133

MPALARDGGQLPLLVFSA MIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDS SVGKSSSYPM
VSESPEDLGALRPQSSGTVYEAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNC
QPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFR

KMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCA
 RNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLKLVGEPLWIRCKAVHVNHGFGTLWELENKAL
 EEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYTTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINAT
 NSSDYEDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQP
 GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPVLAEEASASQASCFSQGYPLPSWTWKKCSDKSP
 NCTEEITEGVWNRKANRKFVFGQWVSSSTLNMSEAIKGLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
 PGPFFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYV
 DFREYEDLDKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKA
 DSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKREKF
 HRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQ
 KRLEEEEDLNVLTFFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICD
 FGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNP
 YPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLA
 DAEEMYQNVDGRVSECPHTYQNRPRFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0109] В Fc-домене, связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и CH2-доменом. Например, в человеческом IgG1, взаимодействие с CD16 преимущественно сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239, и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамина в CH2-домене (см. Sondermann et al., Nature, 406 (6793):267-273). На основании известных доменов, мутации могут быть выбраны с целью усиления или ослабления аффинности связывания с CD16, например, путем использования библиотек фагового дисплея или библиотек кДНК, выставляемых на поверхности дрожжей, или могут быть спроектированы на основании известной трехмерной структуры взаимодействия.

[0110] Сборка гетеродимерных тяжелых цепей антител может осуществляться путем экспрессии двух разных последовательностей тяжелых цепей антитела в одной клетке, что может приводить к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также к сборке гетеродимеров. Промотирование предпочтительной сборки гетеродимеров может осуществляться путем включения разных мутаций в CH3-домен каждой константной области тяжелой цепи антитела, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 и US14/830336. Например, мутации могут быть выполнены в CH3-домене на основе человеческого IgG1 и включать различные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, что позволяет этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Положения аминокислотных замен, проиллюстрированные ниже, все пронумерованы по индексу EU в соответствии с Кабатом (Kabat).

[0111] В одном сценарии, аминокислотная замена в первом полипептиде замещает исходную аминокислоту на аминокислоту большего размера, выбранную из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде замещает исходную аминокислоту

(аминокислоты) на аминокислоту (аминокислоты) меньшего размера, выбранную из аланина (A), серина (S), треонина (T), или валина (V), так чтобы замена на более крупную аминокислоту (выступ) совпадала с поверхностью замены на аминокислоту меньшего размера (отверстие). Например, один полипептид может включать замену T366W, и другой может содержать три замены, включая T366S, L368A, и Y407V.

[0112] Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по изобретению может быть необязательно связан с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнир, СН2- и СН3-домены, с СН1-доменом или без него. В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность константной области является на по меньшей мере 90% идентичной константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3, или константная область IgG4. В некоторых других вариантах реализации, аминокислотная последовательность константной области является на по меньшей мере 90% идентичной константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. Одна или несколько мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например в положениях Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Типичные примеры замен включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D, и K439E.

[0113] В определенных вариантах реализации, мутации, которые могут быть включены в СН1 константной области человеческого IgG1, могут находиться в положениях аминокислот V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171, и/или V173. В определенных вариантах реализации, мутации, которые могут быть включены в Сκ константной области человеческого IgG1, могут находиться в положениях аминокислот E123, F116, S176, V163, S174, и/или T164.

[0114] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в Таблице 3.

Таблица 3		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A

Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

[0115] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в Таблице 4.

Таблица 4		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	K409W	D399V/F405T
Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[0116] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в Таблице 5.

Таблица 5		
	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Набор 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Набор 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Набор 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Набор 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Набор 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0117] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из Таблицы 6.

Таблица 6	
-----------	--

Первый полипептид	Второй полипептид
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

[0118] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен, приведенного в Таблице 7, где положение (положения), указанные в колонке Первый полипептид, заменяют на любую известную отрицательно заряженную аминокислоту, и положение (положения), указанные в колонке Второй полипептид, заменяют на любую известную положительно заряженную аминокислоту.

Таблица 7	
Первый полипептид	Второй полипептид
K392, K370, K409, или K439	D399, E356, или E357

[0119] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора, приведенного в Таблице 8, где положение (положения), указанные в колонке Первый полипептид, заменяют на любую известную положительно заряженную аминокислоту, и положение (положения), указанные в колонке второй Полипептид, заменяют на любую известную отрицательно заряженную аминокислоту.

Таблица 8	
Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356, или E357	K409, K439, K370, или K392

[0120] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора в Таблице 9.

Таблица 9	
Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A, и Y407V	T350V, T366L, K392L, и T394W

[0121] Альтернативно, или дополнительно, структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть повышена путем введения S354C в первой или второй полипептидной цепи, и Y349C в противоположащей полипептидной цепи, которые образуют искусственный дисульфидный мостик на поверхности раздела двух полипептидов.

[0122] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в

выбранных из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одной или нескольких позициях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399.

[0134] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

[0135] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

[0136] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T.

[0137] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

[0138] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

[0139] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной

области IgG1 заменой T366W.

[0140] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

[0141] В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, и при этом аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

[0142] Мультиспецифические белки, описанные выше, могут быть получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК, хорошо известной специалистам в данной области техники. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый экспрессионный вектор; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй экспрессионный вектор; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в третий экспрессионный вектор; и первый, второй и третий экспрессионные вектора могут быть стабильно трансфицированы вместе в клетки-хозяева для продуцирования мультимерных белков.

[0143] Для достижения наибольшего выхода мультиспецифического белка, могут быть исследованы разные соотношения первого, второго и третьего экспрессионных векторов для определения оптимального соотношения для трансфекции клеток-хозяев. После трансфекции могут быть выделены отдельные клоны для создания банка клеток с использованием методов, известных специалистам, таких как метод лимитирующих разведений, ИФА, FACS, микроскопия или Clonепix.

[0144] Клоны могут культивироваться в условиях, пригодных для масштабирования биореактора и поддержания экспрессии мультиспецифического белка. Мультиспецифические белки могут быть выделены и очищены с использованием способов, известных специалистам, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, клеточный лизис, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, обменную хроматографию гидрофобных взаимодействий, и хроматографию смешанного режима.

II. ХАРАКТЕРИСТИКИ МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

[0145] Мультиспецифические белки, описанные в данном документе, включают NKG2D-связывающий сайт, CD16-связывающий сайт и FLT3-связывающий сайт. В некоторых вариантах реализации, мультиспецифические белки связываются с клетками,

экспрессирующими NKG2D и/или CD16, такими как ЕК-клетки, и одновременно с опухолевыми клетками, экспрессирующими FLT3. Связывание мультиспецифических белков с ЕК-клетками может повышать активность уничтожения опухолевых клеток ЕК-клетками.

[0146] В некоторых вариантах реализации, мультиспецифические белки связываются с FLT3 с аффинностью, схожей со значениями для соответствующего моноклонального антитела FLT3 (т.е., моноклонального антитела, содержащего такой же FLT3-связывающий сайт, как и входящий в состав мультиспецифических белков). В некоторых вариантах реализации, мультиспецифические белки имеют большую эффективность уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих FLT3, чем соответствующие моноклональные антитела FLT3.

[0147] В определенных вариантах реализации, мультиспецифические белки, описанные в данном документе, включающие NKG2D-связывающий сайт и связывающий сайт FLT3, активируют первичные человеческие ЕК-клетки при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими FLT3. Активация ЕК-клеток сопровождается повышением дегрануляции CD107a и продуцированием цитокина IFN- γ . Кроме того, по сравнению с соответствующим моноклональным антителом FLT3, мультиспецифические белки могут демонстрировать более сильную активацию человеческих ЕК-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих FLT3.

[0148] В определенных вариантах реализации, мультиспецифические белки, описанные в данном документе, которые включают NKG2D-связывающий сайт и связывающий сайт FLT3, повышают активность покоящихся и IL-2-активированных человеческих ЕК-клеток, совместно культивируемых с клетками, экспрессирующими FLT3.

[0149] В определенных вариантах реализации, мультиспецифические белки обладают преимуществом по сравнению с соответствующим моноклональным антителом, связывающимся с FLT3, заключающимся в нацеливании на опухолевые клетки, экспрессирующие средние и низкие уровни FLT3.

III. ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

[0150] Данное изобретение предлагает способы лечения рака с использованием мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе, и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы могут быть использованы для лечения различных видов рака, экспрессирующих FLT3. В некоторых вариантах реализации, рак представляет собой лейкоз, например, острый миелолейкоз, Т-клеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз или волосатоклеточный лейкоз.

[0151] В некоторых других вариантах реализации, рак представляет собой рак молочной железы, яичника, пищевода, мочевого пузыря или желудка, карциному слюнной железы, карциномы слюнных протоков, аденокарциному легкого или агрессивные формы рака матки, такие как серозная карцинома эндометрия матки. В некоторых других

вариантах реализации, рак представляет собой рак головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, эндометриальный рак, рак пищевода, лейкоз, рак легкого, рак печени, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак желудка, рак яичка, или рак матки. В других вариантах реализации, рак представляет собой плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинические кератозы, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, аденокистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, билиарный рак, рак кости, рак костного мозга, бронхиальный рак, карциному бронхиальной железы, карциноид, холангиокарциному, хондросаркому (chondrosarcoma), папиллому/карциному хороидного сплетения, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз, прозрачноклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермального синуса, эндометриальную гиперплазию, эндометриальную стромальную саркому, эндометриоидную аденокарциному, эндотелиоклеточный рак, эпендимальный рак, эпителиальноклеточный рак, саркома Юинга, рак глаза и глазницы, рак женских половых органов, фокальную нодулярную гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластомы (hemangioblastomas), гемангиоэндотелиому, гемангиомы, печеночную аденому, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интерэпителиальную сквамозную неоплазию, рак внутрипеченочных желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак суставов, саркома Капоши, рак почечной лоханки, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, злокачественные лентиго-меланомы, лимфому, рак мужских половых органов, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак рта, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового хода, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, нодулярную меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак ротовой полости, остеосаркому, папиллярную серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, питуитарные опухоли, плазмацитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак синуса, рак кожи, мелкоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак

гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечнополосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеточника, рак уретры, рак мочевого пузыря, рак мочевой системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, вагинальный рак, веррукозную карциному, виному, рак вульвы, хорошо дифференцированную карциному, или опухоль Вильмса.

[0152] В некоторых других вариантах реализации, подлежащий лечению рак представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В определенных вариантах реализации, неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузную В-крупноклеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, экстранодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки, лимфому Беркитта, лимфоплазмацитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, или первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах реализации, неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, периферическая Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная лимфома из естественных киллеров/Т-клеток, Т-клеточная лимфома энтеропатийного типа, подкожная панникулит-подобная Т-клеточная лимфома, анапластическая крупноклеточная лимфома, или периферическая Т-клеточная лимфома.

IV. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

[0153] Другой аспект изобретения предлагает комбинированную терапию. Мультиспецифический связывающий белок, описанный в данном документе, может быть использован в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака.

[0154] Типичные примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии при лечении рака, включают, например, облучение, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубицин, карбоквон, пентостатин, нитракрин, циностафин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин, тимальфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбин, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутамид, дрогенил, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофилан, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфат, эноцитабин, дизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпителиостанол,

форместан, интерферон-альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма (IFN- γ), колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин дифтитокс, интерлейкин-2, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона, и варианты вышеуказанных агентов, которые могут демонстрировать отличное от них связывание со своими когнатными рецепторами, и увеличенный или уменьшенный период полувыведения из сыворотки.

[0155] Дополнительным классом агентов, которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии при лечении рака, являются ингибиторы иммунных контрольных точек. Типичные примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают агенты, которые ингибируют один или несколько из (i) антигена цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA4), (ii) белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), (iii) PDL1 (лиганд запрограммированной гибели 1), (iv) LAG3 (ген активации лимфоцитов 3), (v) B7-H3, (vi) B7-H4, и (vii) TIM3 (Т-клеточный белок 3, содержащий иммуноглобулин и муциновый домен). Ингибитор CTLA4 ипилимумаб был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения меланомы.

[0156] Другими агентами, которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии при лечении рака, являются агенты типа моноклональных антител, специфические к мишеням, не являющимся контрольными точками (например, герцептин), и нецитотоксические агенты (например, ингибиторы тирозинкиназы).

[0157] Другие категории противораковых агентов включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора DNA-PK, совместного ингибитора DNA-PK и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлордезоксиаденозин, ингибитора HDAC, ингибитора сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, совместного ингибитора PARP1 и DHODH, ингибитора протеасомы, ингибитора топоизомеразы-II, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора VEGFR, и ингибитора WEE1; (ii) агонист OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 или ICOS; и (iii) цитокин, выбранный из IL-12, IL-15, GM-CSF и G-CSF.

[0158] Белки по изобретению также могут быть использованы в качестве вспомогательного средства при хирургическом удалении первичного очага поражения.

[0159] Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического агента и относительное время введения могут быть выбраны для достижения желательного эффекта комбинированной терапии. Например, при введении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации, или фармацевтическая композиция или композиции, содержащие

терапевтические агенты, могут быть введены в любом порядке, таком как, например, последовательно, параллельно, вместе, одновременно и т.п. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок может быть введен в то время, когда проявляется профилактический или терапевтический эффект дополнительного терапевтического агента (агентов), или наоборот.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[0160] Данное изобретение также предлагает фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество белка, описанного в данном документе. Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Один или несколько физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также может быть включен в композицию для правильного составления композиции. Пригодные рецептуры для использования в данном изобретении приведены в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств, приведен, например, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0161] Композиция для внутривенной доставки лекарственных средств по данному изобретению может находиться в пакете, шприц-ручке, или шприце. В определенных вариантах реализации, пакет может быть соединен с каналом, состоящим из трубки и/или иглы. В определенных вариантах реализации, композиция может представлять собой лиофилизированную композицию или жидкую композицию. В определенных вариантах реализации, указанная композиция может быть подвергнута сушке вымораживанием (may freeze-dried) (лиофилизирована) и помещена в примерно 12-60 флаконов. В определенных вариантах реализации, композиция может быть лиофилизирована и 45 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В определенных вариантах реализации, от примерно 40 мг до примерно 100 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В определенных вариантах реализации, лиофилизированную композицию из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в композиции лекарственного средства для внутривенного введения. В определенных вариантах реализации, указанная композиция может быть жидкой композицией и храниться по от примерно 250 мг/флакон до примерно 1000 мг/флакон. В определенных вариантах реализации, композиция может быть жидкой композицией и храниться по примерно 600 мг/флакон. В определенных вариантах реализации, композиция может быть жидкой композицией и храниться по примерно 250 мг/флакон.

[0162] Белок может находиться в жидкой водной фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем композицию.

[0163] Такие композиции могут быть стерилизованы с использованием обычных методик стерилизации, или могут быть подвергнуты стерильной фильтрации. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования "как есть", или

лиофилизированы, причем лиофилизированная композиция объединяется со стерильным водным носителем перед введением. Величина pH препаратов типично будет иметь значение от 3 до 11, более предпочтительно, от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно - от 7 до 8, например, 7-7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в множество однодозовых форм, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для обеспечения возможности изменения количества.

[0164] В определенных вариантах реализации, данное изобретение предлагает композицию с увеличенным сроком годности при хранении, включающую белок по данному изобретению, в комбинации с маннитом, лимонной кислоты моногидратом, натрия цитратом, динатрийфосфата дигидратом, натрия дигидрофосфата дигидратом, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой, и гидроксидом натрия.

[0165] В определенных вариантах реализации, водную композицию, содержащую белок по данному изобретению, готовят в забуференном до определенного значения pH растворе. Буфер по данному изобретению может иметь значение pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8, например, от примерно 4,5 до примерно 6,0, или от примерно 4,8 до примерно 5,5, или может иметь pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. Диапазоны значений, промежуточные по отношению к вышеуказанным pH, также должны входить в объем данного раскрытия. Например, диапазоны значений с использованием комбинации любых из вышеуказанных значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов должны рассматриваться как включенные. Примеры буферов, позволяющих устанавливать pH в этом диапазоне значений, включают ацетат (например, ацетат натрия), сукцинат (такие как сукцинат натрия), глюконат, гистидин, цитрат и другие буферы на основе органических кислот.

[0166] В определенных вариантах реализации, композиция включает систему буферов, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8. В определенных вариантах реализации диапазон pH может составлять от примерно 4,5 до примерно 6,0, или от примерно pH 4,8 до примерно 5,5, или в диапазоне pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. В определенных вариантах реализации, система буферов включает лимонной кислоты моногидрат, цитрат натрия, динатрийфосфата дигидрат, и/или натрия дигидрофосфата дигидрат. В определенных вариантах реализации, система буферов содержит примерно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), примерно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), примерно 1,5 мг/мл динатрийфосфата дигидрата (например, 1,53 мг/мл), примерно 0,9 мг/мл натрия дигидрофосфата дигидрата (например, 0,86), и примерно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В определенных вариантах реализации, система буферов включает 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, 0,25-0,5 мг/мл цитрата натрия, 1,25-1,75 мг/мл динатрийфосфата дигидрата, 0,7-1,1 мг/мл натрия дигидрофосфата дигидрата, и 6,0-6,4

мг/мл хлорида натрия. В определенных вариантах реализации, pH композиции регулируют с помощью гидроксида натрия.

[0167] Полиол, который выступает в роли регулятора тоничности (tonicifier) и может стабилизировать антитело, также может быть включен в композицию. Полиол добавляют в композицию в количестве, которое может меняться в зависимости от желательной изотоничности композиции. В определенных вариантах реализации, водная композиция может быть изотонической. Количество добавленного полиола также может быть изменено с учетом молекулярного веса полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (например, маннита), по сравнению с дисахаридом (таким как трегалоза). В определенных вариантах реализации, полиол, который может быть использован в композиции в качестве агента регулирования тоничности, представляет собой маннит. В определенных вариантах реализации, концентрация маннита может составлять от примерно 5 до примерно 20 мг/мл. В определенных вариантах реализации, концентрация маннита может составлять примерно 7,5-15 мг/мл. В определенных вариантах реализации, концентрация маннита может составлять примерно 10-14 мг/мл. В определенных вариантах реализации, концентрация маннита может составлять примерно 12 мг/мл. В определенных вариантах реализации, полиол сорбит может быть включен в композицию.

[0168] Детергент или поверхностно-активное вещество также могут быть добавлены в композицию. Типичные примеры детергентов включают неионные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавленного детергента является таким, чтобы он снижал агрегирование включаемого в композицию антитела и/или минимизировал образование дисперсных частиц в композиции и/или уменьшал адсорбцию. В определенных вариантах реализации, композиция может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В определенных вариантах реализации, композиция может содержать детергент полисорбат 80 или твин (Tween) 80. Твин 80 является термином, используемым для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В определенных вариантах реализации, композиция может содержать от примерно 0,1 мг/мл до примерно 10 мг/мл полисорбата 80, или от примерно 0,5 мг/мл до примерно 5 мг/мл. В определенных вариантах реализации в композицию может быть добавлено примерно 0,1% полисорбата 80.

[0169] В вариантах реализации, композиция белкового продукта по данному изобретению составляется в виде жидкости. Жидкая композиция может быть представлена с концентрацией 10 мг/мл во флаконе 50R типа I в соответствии с Фармакопеей США/Европейской фармакопеей (USP/Ph Eur), закрытом резиновой пробкой и герметизированном алюминиевой обжимной крышечкой. Пробка может быть изготовлена из эластомера, удовлетворяющего требованиям USP и Ph Eur. В определенных вариантах реализации флаконы могут быть наполнены 61,2 мл раствора

белкового продукта для обеспечения извлекаемого объема 60 мл. В определенных вариантах реализации, жидкая композиция может быть разбавлена 0,9% физиологическим раствором.

[0170] В определенных вариантах реализации, жидкая композиция по изобретению может быть приготовлена в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром в количестве, обеспечивающем стабилизацию. В определенных вариантах реализации, жидкая композиция может быть приготовлена в водном носителе. В определенных вариантах реализации, может быть добавлен стабилизатор в количестве, не превышающем такого, которое может привести к вязкости, нежелательной или непригодной для внутривенного введения. В определенных вариантах реализации, сахар может быть дисахаридами, например, сахарозой. В определенных вариантах реализации, жидкая композиция может также включать один или несколько буферных агентов, поверхностно-активное вещество и консервант.

[0171] В определенных вариантах реализации, значение pH жидкой композиции может быть установлено путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах реализации, фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой хлористоводородную кислоту. В определенных вариантах реализации, основание может быть гидроксидом натрия.

[0172] Дополнительно к агрегированию, деамидирование является обычным вариантом пептидных и белковых продуктов, который может возникать в процессе ферментации, сбора урожая/механической очистки клеток, очистки, хранения лекарственной субстанции/лекарственного продукта и во время анализа образца. Деамидирование представляет собой потерю NH_3 из белка, образующего промежуточный сукцинимид, который подвергается гидролизу. Промежуточный сукцинимид приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Промежуточный сукцинимид сложно выделить из-за его нестабильности в водных условиях. Фактически, деамидирование типично может быть определено по увеличению массы на 1 дальтон. Деамидирование аспарагина приводит к аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоте. Параметры, влияющие на скорость деамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую константу растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, прилегающие к Asn в пептидной цепи, влияют на скорость деамидирования. Gly и Ser, расположенные следом за Asn в белковой последовательности, приводят к более высокой чувствительности к деамидированию.

[0173] В определенных вариантах реализации, жидкая композиция по данному изобретению может храниться в условиях определенных pH и влажности для предотвращения деаминирования белкового продукта.

[0174] Водный носитель представляет интерес для данного изобретения, если он является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и пригоден для приготовления жидкой композиции. Показательные примеры

носителей включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный до определенного значения pH раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0175] Консервант может быть необязательно добавлен в композиции по данному документу для уменьшения бактериального воздействия. Добавление консерванта может, например, способствовать приготовлению композиций для многократного использования (многодозовых).

[0176] Композиции для внутривенного (IV) введения могут быть предпочтительным путем введения в конкретных случаях, таких как для пациента, находящегося в больнице после трансплантации и получающего все лекарственные средства внутривенным путем. В определенных вариантах реализации, жидкую композицию разводят 0,9% раствором хлорида натрия перед введением. В определенных вариантах реализации, разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и пригодным для введения путем внутривенной инфузии.

[0177] В определенных вариантах реализации, солевые или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве 10-200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с “основообразующими” металлами или аминами. В определенных вариантах реализации, буфер может быть фосфатным буфером. В определенных вариантах реализации, буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, в случае которых противоионом могут быть ионы натрия, калия или аммония.

[0178] Консервант может быть необязательно добавлен в композиции по данному документу для уменьшения бактериального воздействия. Добавление консерванта может, например, способствовать приготовлению композиций для многократного использования (многодозовых).

[0179] Водный носитель представляет интерес для данного изобретения, если он является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и пригоден для приготовления жидкой композиции. Показательные примеры носителей включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный до определенного значения pH раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0180] Белок по данному изобретению может входить в состав лиофилизированной композиции, содержащей белки и лиопротектор. Лиопротектор может быть сахаром, например, дисахаридами. В определенных вариантах реализации, лиопротектор может быть сахарозой или мальтозой. Лيوфилизированная композиция может также содержать один или несколько буферных агентов, поверхностно-активное вещество, наполнитель и/или консервант.

[0181] Количество сахарозы или мальтозы, пригодное для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может составлять, по весовому соотношению белка к сахарозе или мальтозе, по меньшей мере 1:2. В определенных вариантах реализации, весовое соотношение белка к сахарозе или мальтозе может составлять от 1:2 до 1:5.

[0182] В определенных вариантах реализации, pH композиции перед лиофилизацией может устанавливаться путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах реализации фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой хлористоводородную кислоту. В определенных вариантах реализации, фармацевтически приемлемым основанием может быть гидроксид натрия.

[0183] Перед лиофилизацией, величина pH раствора, содержащего белок по данному изобретению, может быть отрегулирована до значения от 6 до 8. В определенных вариантах реализации, диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

[0184] В определенных вариантах реализации, солевые или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве 10-200 mM. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с “основообразующими” металлами или аминами. В определенных вариантах реализации, буфер может быть фосфатным буфером. В определенных вариантах реализации, буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, в случае которых противоионом могут быть ионы натрия, калия или аммония.

[0185] В определенных вариантах реализации может быть добавлен наполнитель. Наполнитель представляет собой соединение, увеличивающее массу лиофилизированной смеси и создающее физическую структуру лиофилизированного осадка (например, способствует получению по существу однородного лиофилизированного осадка, сохраняющего структуру с открытыми порами). Показательные примеры наполнителей включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лيوфилизированные композиции по данному изобретению могут содержать такие наполнители.

[0186] Консервант может быть необязательно добавлен в композиции по данному документу для уменьшения бактериального воздействия. Добавление консерванта может, например, способствовать приготовлению композиций для многоразового использования (многодозовых).

[0187] В определенных вариантах реализации, лиофилизированный лекарственный продукт может быть восстановлен с помощью водного носителя. Водный носитель представляет интерес для данного изобретения, если он является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и пригоден для приготовления жидкой композиции после лиофилизации. Показательные примеры разбавителей включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую

воду для инъекций (BWFI), забуференный до определенного значения pH раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0188] В определенных вариантах реализации, лиофилизированный лекарственный продукт по данному изобретению восстанавливают с помощью стерильной воды для инъекций, USP (SWFI) или 0,9% хлорида натрия для инъекций, USP. При восстановлении, лиофилизированный порошок растворяют с образованием раствора.

[0189] В определенных вариантах реализации, лиофилизированный белковый продукт по данному изобретению восстанавливают до примерно 4,5 мл водой для инъекций и разбавляют 0,9% физиологическим раствором (раствором хлорида натрия).

[0190] Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по данному изобретению могут меняться для обеспечения количества активного ингредиента, позволяющего эффективно обеспечивать желательный терапевтический ответ для конкретных пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента.

[0191] Конкретная доза может быть единой дозой для всех пациентов, например, 50-5000 мг белка. Альтернативно, доза пациента может регулироваться в соответствии с примерным весом тела или площадью поверхности пациента. Другие факторы, влияющие на определение пригодной дозировки, могут включать заболевание или состояние, лечение или профилактика которых должны проводиться, тяжесть болезни, путь введения, и возраст, пол и медицинское состояние пациента. Дополнительное уточнение расчетов, необходимых для определения пригодной дозировки для лечения является рутинным для специалистов в данной области техники, особенно с учетом информации о дозировках и анализах, раскрытой в данном документе. Дозировка также может быть определена путем использования известных анализов для определения дозировок, используемых в сочетании с соответствующими данными доза-ответ. Дозировка для индивидуального пациента может регулироваться в процессе контроля прогрессирования заболевания. Могут быть измерены уровни нацеливаемого конструкта или комплекса в крови пациента для определения необходимости регулирования дозировки для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может быть использована для определения того, какие нацеливаемые конструкты и/или комплексы, и их дозировки, будут наиболее вероятно эффективными для данного индивидуума (Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[0192] В общем, дозировки в расчете на вес тела составляют от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг на кг веса тела, например, от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мкг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мкг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мкг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мкг/кг веса тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 0,1

мкг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мкг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мкг/кг веса тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мкг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг/кг веса тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мкг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мкг/кг веса тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг/кг веса тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 50 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 50 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 50 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мкг/кг веса тела, от примерно 100 мкг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 100 мкг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 100 мкг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 100 мкг до примерно 1 мг/кг веса тела, от примерно 1 мг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 1 мг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 1 мг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 10 мг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 10 мг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 50 мг до примерно 100 мг/кг веса тела.

[0193] Дозы могут вводиться один или несколько раз в день, в неделю, в месяц или в год, или даже один раз за период от 2 до 20 лет. Рядовые специалисты в данной области техники могут легко рассчитать частоту повторения доз на основании измеренных времен пребывания и концентраций нацеливаемого конструкта или комплекса в телесных жидкостях или тканях. Введение по данному изобретению может быть внутривенным, интраартериальным, интраперитонеальным, внутримышечным, подкожным, интраплевральным, интратекальным, внутриполостным, путем перфузии через катетер или путем прямой внутриочаговой инъекции. Такое введение может осуществляться один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц, и один или несколько раз в год.

[0194] В приведенном выше описании представлены многочисленные аспекты и варианты реализации изобретения. Патентная заявка положительным образом предусматривает все комбинации и изменения аспектов и вариантов реализации.

ПРИМЕРЫ

[0195] Описываемое в общем изобретение будет лучше понятно со ссылками на следующие примеры, которые включены только с целью иллюстрации определенных аспектов и вариантов реализации данного изобретения, и не должны ограничивать изобретение.

Пример 1 - NKG2D-связывающие домены связываются с NKG2D

NKG2D-связывающие домены связываются с очищенным рекомбинантным NKG2D

[0196] Последовательности нуклеиновой кислоты эктодоменов NKG2D человека, мыши или яванского макака были слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующей Fc-домены человеческого IgG1 и введены в клетки млекопитающего для экспрессии. После очистки, гибридные белки NKG2D-Fc адсорбировали в лунках микропланшетов. После блокирования лунок бычьим сывороточным альбумином для предотвращения неспецифического связывания, NKG2D-связывающие домены титровали и добавляли в лунки с предварительно адсорбированными гибридными белками NKG2D-Fc. Связывание первичного антитела детектировали с использованием вторичного антитела, которое было конъюгировано с пероксидазой хрена и специфически распознает легкую цепь каппа человека во избежание перекрестной реактивности Fc. 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (ТМВ), являющийся субстратом пероксидазы хрена, добавляли в лунки для визуализации сигнала связывания, величину поглощения которого измеряли при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. Клон NKG2D-связывающего домена, изотипический контроль или положительный контроль (содержащий тяжелую цепь и переменные домены легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышинного NKG2D, доступные от фирмы eBioscience) добавляли в каждую лунку.

[0197] Изотипический контроль продемонстрировал минимальное связывание с рекомбинантными белками NKG2D-Fc, в то время как положительный контроль наиболее сильно связывался с рекомбинантными антигенами. NKG2D-связывающие домены, продуцируемые всеми клонами, продемонстрировали связывание со всеми рекомбинантными белками NKG2D-Fc человека, мыши и яванского макака, хотя и с различными аффинностями для разных клонов. В общем, каждый анти-NKG2D клон связывался с рекомбинантными NKG2D-Fc человека (Фиг. 3) и яванского макака (Фиг. 4) со схожими аффинностями, и с более низкой аффинностью - с рекомбинантным NKG2D-Fc мыши (Фиг. 5).

NKG2D-связывающие домены связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D

[0198] Клеточные линии EL4 мышинной лимфомы были модифицированы для экспрессии химерных антигенных рецепторов сигнального домена NKG2D-CD3-дзета человека или мыши. NKG2D-связывающий клон, изотипический контроль или положительный контроль использовали в концентрации 100 нМ для окрашивания внеклеточного NKG2D, экспрессируемого на клетках EL4. Связывание антитела детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител против человеческого IgG. Клетки анализировали методом проточной цитометрии, и величину кратности к фону (fold-over-background, FOB) рассчитывали с использованием

средней интенсивности флуоресценции (СИФ) экспрессирующих NKG2D клеток по сравнению с исходными клетками EL4.

[0199] NKG2D-связывающие домены, продуцируемые всеми клонами, связывались с EL4-клетками, экспрессирующими человеческий и мышинный NKG2D. Антитела положительного контроля (содержащие тяжелую цепь и вариабельные домены легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышинного NKG2D, поставляемые фирмой eBioscience) давали наилучшие величины FOB сигнала связывания. Аффинность связываний NKG2D для всех клонов была схожей для клеток, экспрессирующих NKG2D человека (Фиг. 6) и NKG2D мыши (Фиг. 7).

Пример 2 - NKG2D-связывающие домены блокируют связывание природного лиганда с NKG2D

Конкуренция с ULBP-6

[0200] Рекомбинантные белки человеческого NKG2D-Fc адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания. Добавляли в лунки насыщающую концентрацию ULBP-6-His-биотина, с последующим добавлением клонов NKG2D-связывающего домена. После 2-часовой инкубации, лунки промывали и ULBP-6-His-биотин, оставшийся связанным с покрытым NKG2D-Fc лунками, детектировали с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и субстрата ТМВ. Измеряли оптическую плотность при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычета фонового значения, рассчитывали специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белками NKG2D-Fc по проценту ULBP-6-His-биотина, заблокированного от связывания с белками NKG2D-Fc в лунках. Антитело положительного контроля (содержащее тяжелую цепь и вариабельные домены легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104) и различные NKG2D-связывающие домены блокировали связывание ULBP-6 с NKG2D, в то время как изотипический контроль продемонстрировал незначительную конкуренцию с ULBP-6 (Фиг. 8).

[0201] Последовательность ULBP-6 представлена SEQ ID NO:108

MAAAAI PALLLCLPLL FLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGQ
VDEKTF LHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPL TLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLEDSEKRMWTTVHPGARKMKEK
WENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTL
ILCCLLIILPCFILPGI (SEQ ID NO:108)

Конкуренция с MICA

[0202] Рекомбинантные белки человеческого MICA-Fc адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания. Добавляли в лунки NKG2D-Fc-биотин, а затем NKG2D-связывающие домены. После инкубации и промывки, NKG2D-Fc-биотин, оставшийся связанным с покрытыми MICA-Fc лунками, детектировали с использованием стрептавидина-HRP (конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена) и субстрата ТМВ.

Измеряли оптическую плотность при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычета фонового значения, рассчитывали специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белки NKG2D-Fc по проценту NKG2D-Fc-биотина, заблокированного от связывания с покрытыми MICA-Fc лунками. Антитело положительного контроля (содержащее тяжелую цепь и вариабельные домены легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104) и различные NKG2D-связывающие домены блокировали связывание MICA с NKG2D, в то время как изотипический контроль продемонстрировал незначительную конкуренцию с MICA (Фиг. 9).

Конкуренция с Rae-1 дельта

[0203] Рекомбинантный мышинный Rae-1дельта-Fc (приобретен у R&D Systems) адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания. Добавляли в лунки мышинный NKG2D-Fc-биотин, а затем NKG2D-связывающие домены. После инкубации и промывки, NKG2D-Fc-биотин, оставшийся связанным с покрытыми Rae-1дельта-Fc лунками, детектировали с использованием стрептавидина-HRP и субстрата TMB. Измеряли оптическую плотность при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычета фонового значения, специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белками NKG2D-Fc рассчитывали по проценту NKG2D-Fc-биотина, заблокированного от связывания с покрытыми Rae-1дельта-Fc лунками. Положительный контроль (содержащий тяжелую цепь и вариабельные домены легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышинного NKG2D, доступные от фирмы eBioscience) и различные клоны NKG2D-связывающего домена блокировали связывание Rae-1дельта с мышинным NKG2D, в то время как антитело изотипического контроля продемонстрировало незначительную конкуренцию с Rae-1дельта (Фиг. 10).

Пример 3 - Клоны NKG2D-связывающего домена активируют NKG2D

[0204] Последовательности нуклеиновой кислоты человеческого и мышинного NKG2D сливали с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный домен CD3-дзета, для получения конструкторов химерного антигенного рецептора (CAR). Конструкторы NKG2D-CAR затем клонировали в ретровирусный вектор с использованием метода сборки Гибсона (Gibson assembly) и трансфицировали в клетки epr293 для продуцирования ретровируса. Клетки EL4 инфицировали вирусами, содержащими NKG2D-CAR, вместе с 8 мкг/мл полибрена. Через 24 часа после инфекции, уровни экспрессии NKG2D-CAR в клетках EL4 анализировали методом проточной цитометрии и выбирали клоны, экспрессирующие высокие уровни NKG2D-CAR на клеточной поверхности.

[0205] Для определения того, активируют ли NKG2D-связывающие домены NKG2D, их адсорбировали в лунках микропланшета, и NKG2D-CAR клетки EL4 культивировали в покрытых фрагментом антитела лунках в течение 4 часов в присутствии брэфельдина-A и монензина. Внутриклеточное продуцирование ФНО- α , являющегося индикатором активации NKG2D, оценивали методом проточной цитометрии. Процент

положительных по ФНО- α клеток нормировали по отношению к клеткам, обработанным положительным контролем. Все NKG2D-связывающие домены активировали как человеческий NKG2D (Фиг. 11), так и мышинный NKG2D (Фиг. 12).

Пример 4 - NKG2D-связывающие домены активируют ЕК-клетки

Первичные человеческие ЕК-клетки

[0206] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из лейкоцитной пленки периферической крови человека путем центрифугирования в градиенте плотности. ЕК-клетки ($CD3^- CD56^+$) выделяли из МКПК с использованием негативной селекции с магнитными шариками, и чистота выделенных ЕК-клеток составляла типично $>95\%$. Выделенные ЕК-клетки затем культивировали в средах, содержащих 100 нг/мл IL-2 в течение 24-48 часов перед их переносом в лунки микропланшета, на котором были адсорбированы NKG2D-связывающие домены, и культивировали в средах, содержащих конъюгированное с флуорофором анти-CD107a антитело, брефельдин-А и монензин. После культивирования ЕК-клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием конъюгированного с флуорофором антитела против CD3, CD56 и IFN- γ . Анализировали окрашивание $CD3^- CD56^+$ клеток CD107a и IFN- γ для оценки активации ЕК-клеток. Увеличение числа CD107a/IFN- γ дважды положительных клеток указывает на улучшение активации ЕК-клеток посредством взаимодействия с двумя активирующими рецепторами, а не с одним рецептором. NKG2D-связывающие домены и положительный контроль (например, вариабельный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO:101 или SEQ ID NO:103, и вариабельный домен легкой цепи, представленный SEQ ID NO:102 или SEQ ID NO:104) продемонстрировали более высокий процент ЕК-клеток, становящихся $CD107a^+$ и IFN- γ^+ , чем изотипический контроль (на Фиг. 13 и Фиг. 14 приведены данные двух независимых экспериментов, в которых для приготовления ЕК-клеток использовались МКПК разных доноров).

Первичные мышинные ЕК-клетки

[0207] Извлекали селезенки мышей C57Bl/6 и продавливали через сито 70 мкм для приготовления клеточной суспензии для получения одноклеточной суспензии. Осадок клеток собирали центрифугированием и ресуспендировали в буфере для лизиса АСК (приобретен у фирмы Thermo Fisher Scientific #A1049201; 155 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната калия, 0,01 мМ ЭДТА) для удаления красных кровяных клеток. Оставшиеся клетки культивировали с 100 нг/мл hIL-2 в течение 72 часов, после чего собирали и готовили для выделения ЕК-клеток. ЕК-клетки ($CD3^- NK1.1^+$) затем выделяли из клеток селезенки с использованием метода отрицательного истощения с магнитными шариками с чистотой типично $>90\%$. Очищенные ЕК-клетки культивировали в средах, содержащих 100 нг/мл mIL-15, в течение 48 часов с последующим переносом в лунки микропланшета, на котором были адсорбированы NKG2D-связывающие домены, и культивировали в средах, содержащих конъюгированное с флуорофором анти-CD107a антитело, брефельдин-А и монензин. После культивирования в лунках, покрытых

NKG2D-связывающим доменом, ЕК-клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием конъюгированного с флуорофором антитела против CD3, NK1.1 и IFN- γ . Анализировали окрашивание CD3⁻ NK1.1⁺ клеток с помощью CD107a и IFN- γ для оценки активации ЕК-клеток. Увеличение CD107a/IFN- γ дважды положительных клеток указывает на улучшение активации ЕК-клеток посредством взаимодействия с двумя активирующими рецепторами, а не с одним рецептором. NKG2D-связывающие домены и положительный контроль (выбранный из клонов MI-6 и CX-5 против мышинного NKG2D, доступных от фирмы eBioscience) продемонстрировали более высокий процент ЕК-клеток, становящихся CD107a⁺ и IFN- γ ⁺, чем изотипический контроль (на Фиг. 15 и Фиг. 16 приведены данные двух независимых экспериментов, с использованием в каждом препаратов ЕК-клеток разных мышей).

ПРИМЕР 5 - NKG2D-связывающие домены обеспечивают цитотоксичность опухолевых клеток-мишеней

[0208] Анализы активации первичных человеческих и мышинных ЕК-клеток продемонстрировали повышенные маркеры цитотоксичности на ЕК-клетках после инкубации с NKG2D-связывающими доменами. Для выяснения того, приводит ли это к повышению клеточного лизиса опухоли, использовали клеточный анализ, в котором каждый NKG2D-связывающий домен был преобразован в моноспецифическое антитело. В качестве одного нацеливающего фрагмента использовалась Fc-область, в то время как Fab-область (NKG2D-связывающий домен) выступала в роли другого нацеливающего фрагмента для активации ЕК-клеток. Клетки THP-1, имеющие человеческое происхождение и экспрессирующие высокие уровни Fc-рецепторов, использовались как опухолевая мишень, и был использован набор для определения цитотоксичности Perkin Elmer DELFIA Cytotoxicity Kit. Клетки THP-1 метили реагентом BATDA, и ресуспендировали в количестве 10⁵/мл в культуральных средах. Меченые клетки THP-1 затем объединяли с антителами NKG2D и выделяли мышинные ЕК-клетки в лунках микротитровального планшета при 37°C в течение 3 часов. После инкубации, отбирали 20 мкл супернатанта культуры, смешивали с 200 мкл раствора европия и инкубировали со встряхиванием в течение 15 минут в темноте. Флуоресценцию измеряли во времени с помощью планшет-ридера PheraStar, оснащенного модулем флуоресценции с временным разрешением (возбуждение 337 нм, эмиссия 620 нм), и специфический лизис рассчитывали в соответствии с инструкцией к набору.

[0209] Положительный контроль, ULBP-6 - природный лиганд NKG2D, продемонстрировал повышенный специфический лизис клеток-мишеней THP-1 мышинными ЕК-клетками. Антитела NKG2D также повышали специфический лизис клеток-мишеней THP-1, в то время как антитело изотипического контроля продемонстрировали пониженный специфический лизис. Пунктирная линия показывает специфический лизис клеток THP-1 мышинными ЕК-клетками без добавленного антитела (Фиг. 17).

Пример 6 - Антитела NKG2D демонстрируют высокую термостабильность

[0210] Температуру плавления NKG2D-связывающих доменов оценивали с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии. Экстраполированные кажущиеся температуры плавления имеют высокие значения по сравнению с типичными антителами IgG1 (Фиг. 18).

Пример 7 - Синергическая активация человеческих ЕК-клеток путем перекрестного связывания NKG2D и CD16

Анализ активации первичных человеческих ЕК-клеток

[0211] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из лейкоцитной пленки периферической крови человека путем центрифугирования в градиенте плотности. ЕК-клетки очищали от МКПК с использованием негативных магнитных шариков (StemCell #17955). ЕК-клетки были $>90\%$ CD3⁺CD56⁺ по результатам определения методом проточной цитометрии. Затем проводили экспансию клеток 48 часов в средах, содержащих 100 нг/мл hIL-2 (Peprotech #200-02), перед использованием в анализах активации. Антитела наносили на 96-луночный плоскодонный планшет в концентрации 2 мкг/мл (анти-CD16, Biolegend #302013) и 5 мкг/мл (анти-NKG2D, R&D #MAB139) в 100 мкл стерильном PBS (фосфатно-солевой буфер) в течение ночи при 4°C с последующим тщательным промыванием лунок для удаления избытка антитела. Для оценки дегрануляции, активированные IL-2 ЕК-клетки ресуспендировали при 5×10^5 клеток/мл в культуральных средах с добавкой 100 нг/мл человеческого IL-2 (hIL2) и 1 мкг/мл конъюгированного с APC анти-CD107a mAb (Biolegend #328619). Затем добавляли 1×10^5 клеток/лунку на покрытые антителом планшеты. Ингибиторы транспорта белка брэфельдин А (BFA, Biolegend #420601) и монензин (Biolegend #420701) добавляли в конечном разведении 1:1000 и 1:270, соответственно. Клетки на планшетах инкубировали в течение 4 часов при 37°C в 5% CO₂. Для внутриклеточного окрашивания IFN- γ , ЕК-клетки метили анти-CD3 (Biolegend #300452) и анти-CD56 mAb (Biolegend #318328), и затем фиксировали, пермеабелизировали и метили анти-IFN- γ mAb (Biolegend #506507). ЕК-клетки анализировали на экспрессию CD107a и IFN- γ методом проточной цитометрии после гейтирования на живые CD56⁺CD3⁺ клетки.

[0212] Для исследования относительной активности комбинации рецепторов было проведено перекрестное связывание NKG2D или CD16, и совместное перекрестное связывание обоих рецепторов посредством иммобилизованной на планшете стимуляции. Как показано на Фигуре 19 (Фиг. 19А-19С), комбинированная стимуляция CD16 и NKG2D приводила к сильно повышенным уровням CD107a (дегрануляция) (Фиг. 19А) и/или продуцированию IFN- γ (Фиг. 19В). Пунктирные линии показывают аддитивный эффект индивидуальной стимуляции каждого рецептора.

[0213] Уровни CD107a и внутриклеточное продуцирование IFN- γ активированных IL-2 ЕК-клеток анализировали после 4 часов стимуляции иммобилизованными на планшете анти-CD16, анти-NKG2D, или комбинацией обоих моноклональных антител. На графиках представлены средние значения ($n=2$) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Фиг. 19А демонстрирует уровни CD107a; Фиг. 19В демонстрирует уровни IFN- γ ; Фиг. 19С

демонстрирует уровни CD107a и IFN- γ . Данные, приведенные на Фиг. 19A-19C, отображают результаты пяти независимых экспериментов с использованием пяти разных здоровых доноров.

Пример 8 - Оценка TriNKET, связывающихся с экспрессируемым клетками человеческим NKG2D

[0214] Клеточные линии мышинной лимфомы EL4 были генетически модифицированы для экспрессии человеческого NKG2D. Мультиспецифические связывающие белки, например, триспецифические связывающие белки (TriNKET), каждый из которых содержит NKG2D-связывающий домен, FLT3-связывающий домен, и Fc-домен, связывающийся с CD16, тестировали на их аффинность связывания с внеклеточным NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4. TriNKET разбавляли до 20 мкг/мл, и затем проводили серийные разбавления. Связывание TriNKET с NKG2D детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител против человеческого IgG. Клетки затем анализировали методом проточной цитометрии и среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) нормировали по контролям вторичного антитела для получения значений кратности к фону (FOB).

[0215] Тестируемые TriNKET представляли собой A44-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-27744; и FLT3-связывающий домен, полученный из моноклонального антитела FLT3 IMCEB10, например, путем включения вариабельной области тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO:109, и вариабельной области легкой цепи, представленной SEQ ID NO:113), A44-TriNKET-FLT3-4G8 (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-27744; и FLT3-связывающий домен, выделенный из моноклонального антитела 4G8, например, путем включения вариабельной области тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO:117, и вариабельной области легкой цепи, представленной SEQ ID NO:121), A49-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-27749 и FLT3-связывающий домен, выделенный из моноклонального антитела FLT3 IMCEB10, например, путем включения вариабельной области тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO:109, и вариабельной области легкой цепи, представленной SEQ ID NO:113), A49-TriNKET-FLT3-4G8 (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-27749 и FLT3-связывающий домен, выделенный из моноклонального антитела 4G8, например, путем включения вариабельной области тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO:117, и вариабельной области легкой цепи, представленной SEQ ID NO:121), C26-TriNKET-FLT3-4G8 (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-28226; и FLT3-связывающий домен, выделенный из моноклонального антитела 4G8, например, путем включения вариабельной области тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO:117, и вариабельной области легкой цепи, представленной SEQ ID NO:121). Моноклональное антитело FLT3 IMCEB10 было использовано в качестве контроля. TriNKET, содержащие NKG2D-связывающий домен (A44, A49, или C26), продемонстрировали связывание с NKG2D, экспрессируемым на клеточной поверхности. TriNKET, содержащие тот же NKG2D-связывающий домен, но другой FLT3-

связывающий домен, продемонстрировало схожую аффинность связывания с NKG2D на клеточной поверхности (Фиг. 35).

Пример 9 - Оценка связывания TriNKET с FLT3, экспрессируемым на раковых клетках

[0216] Клеточные линии ОМЛ человека (Molm-13 и EOL-1), экспрессирующие FLT3, использовали для оценки связывания специфических к FLT3 TriNKET с опухолеассоциированным антигеном. TriNKET инкубировали с клетками и связывание детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител против человеческого IgG. Клетки анализировали методом проточной цитометрии и среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) нормировали по контролям вторичного антитела для получения значений кратности к фону (FOB).

[0217] Специфические к FLT3 TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен IMCEB10 или 4G8, продемонстрировали положительное связывание с клетками Molm-13 и EOL-1 (Фиг. 36А и Фиг. 36В). Связывание TriNKET, содержащих FLT3-связывающий домен IMCEB10 или 4G8, с клеточными линиями ОМЛ человека было независимым от NKG2D-связывающих доменов. TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен 4G8, продемонстрировали более высокие максимальные значения связывания и EC₅₀.

Пример 10 - Интернализация специфических к FLT3 TriNKET на экспрессирующих FLT3 клетках

[0218] Клеточные линии ОМЛ человека Molm-13 и EOL-1 использовали для оценки интернализации специфических к FLT3 TriNKET после связывания с FLT3, экспрессируемым на клеточной поверхности. TriNKET или моноклональное антитело линтузумаб разбавляли до 20 мкг/мл и использовали для окрашивания клеток. После окрашивания, две трети образца помещали на ночь при 37°C для протекания интернализации, и оставшуюся треть образца детектировали с использованием конъюгированного с флуорофором вторичного антитела против человеческого IgG, получая исходное значение СИФ. После 2 часов и 20 часов инкубации при 37 °C, образцы извлекали из инкубатора, и связанное антитело на поверхности клеток детектировали с использованием конъюгированного с флуорофором вторичного антитела против человеческого IgG, получая значения СИФ для образца. Интернализацию рассчитывали следующим образом: % интернализации = (1 - (СИФ образца/исходная СИФ)) * 100%.

[0219] Фиг. 37А и 37В демонстрируют интернализацию специфических к FLT3 TriNKET после инкубации с клетками EOL-1 и Molm-13, соответственно. Анти-CD33 моноклональное антитело линтузумаб использовали в качестве положительного контроля для интернализации, поскольку CD33 экспрессируется на обоих клеточных линиях Molm-13 и EOL-1. Линтузумаб продемонстрировал высокие уровни интернализации на обоих клеточных линиях, и интернализация возрастала со временем. TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен IMCEB10, продемонстрировали более высокий уровень интернализации после 2 часов инкубации по сравнению с TriNKET, содержащими FLT3-связывающий домен 4G8. После 20 часов инкубации, TriNKET, содержащие FLT3-

связывающий домен 4G8 и TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен IMCEB10, продемонстрировали схожие уровни интернализации на клетках.

Пример 11 - TriNKET повышают цитотоксичность человеческих ЕК-клеток по отношению к раковым клеткам

[0220] Для тестирования способности человеческих ЕК-клеток лизировать экспрессирующие FLT3 раковые клетки в присутствии специфических к FLT3 TriNKET, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли и готовили к выделению ЕК-клеток. МКПК выделяли из лейкоцитной пленки из периферической крови человека путем центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные МКПК промывали и готовили к выделению ЕК-клеток. ЕК-клетки выделяли с использованием метода негативной селекции с магнитными шариками, и чистота выделенных ЕК-клеток составляла типично >90% CD3-CD56+. Выделенные ЕК-клетки культивировали в средах, содержащих 100 нг/мл IL-2, или оставляли на ночь в состоянии покоя без цитокина. Активированные с помощью IL-2- или покоящиеся ЕК-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

[0221] Все анализы цитотоксичности готовили следующим образом: FLT3-положительные опухолевые клетки EOL-1 собирали из культуры, промывали PBS (фосфатно-солевым буфером), и ресуспендировали в питательных средах при 10^6 /мл для мечения реагентом BATDA (бис(ацетоксиметил)-2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоновая кислота) (Perkin Elmer C136-100). При мечении клеток-мишеней придерживались инструкций производителя. После мечения, клетки промывали 3 раза HBS и ресуспендировали при $0,5-1,0 \times 10^5$ /мл в культуральных средах. Для приготовления лунок фона, отбирали аликвоту меченых клеток, и клетки отделяли от среды центрифугированием. Осторожно добавляли 100 мкл среды в лунки для трех параллельных анализов, не взбалтывая осадок клеток. Добавляли 100 мкл меченых BATDA клеток в каждую лунку 96-луночного планшета. Лунки предохраняли от попадания клеток-мишеней для определения спонтанного высвобождения, и лунки подготавливали к максимальному лизису клеток-мишеней путем добавления 1% тритона X. Моноклональные антитела FLT3 или специфические к FLT3 TriNKET разбавляли в культуральных средах и 50 мкл разбавленных моноклональных антител или TriNKET добавляли в каждую лунку. Покоящиеся и/или активированные ЕК-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при $10^5-2,0 \times 10^6$ /мл в культуральных средах, в зависимости от желательного соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням. 50 мкл ЕК-клеток добавляли в каждую лунку планшета, доводя общий объем культуры до 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2-3 часов перед проявлением анализа.

[0222] После культивирования в течение 2-3 часов, планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут. Переносили 20 мкл супернатанта культуры на чистый микропланшет, поставляемый производителем, и добавляли в каждую лунку 200 мкл раствора европия при комнатной

температуре. Планшет защищали от света и инкубировали на встряхивателе для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывали с использованием инструментов Victor 3 или SpectraMax i3X. Рассчитывали % специфического лизиса следующим образом: % Специфического лизиса = ((Экспериментальное высвобождение - Спонтанное высвобождение) / (Максимальное высвобождение - Спонтанное высвобождение)) * 100%.

[0223] Специфические к FLT3 TriNKET опосредовали цитотоксичность человеческих ЕК-клеток по отношению к FLT3-положительным раковым клеткам EOL-1. Как показано на Фиг. 38А, оба TriNKET (A49-TriNKET-IMCEB10 и A44-TriNKET-IMCEB10) были способны усиливать цитотоксическую активность ЕК-клеток по отношению к раковым клеткам дозозависимым образом. Оба TriNKET были значительно более активными, чем соответствующее моноклональное FLT3-антитело IMCEB10. Как видно на Фиг. 38В, TriNKET (A49-TriNKET-4G8, A44-TriNKET-4G8, и C26-TriNKET-4G8) были способны усиливать цитотоксическую активность ЕК-клеток по отношению к раковым клеткам дозозависимым образом. TriNKET являются значительно более сильнодействующими, чем соответствующее моноклональное FLT3-антитело 4G8. Кроме того, TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен 4G8, были более активными в опосредовании цитотоксичности человеческих ЕК-клеток, чем TriNKET, содержащие FLT3-связывающий домен IMCEB10.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛОК

[0224] Полное описание всех патентных документов и научных статей, упоминаемых в данном документе, включено сюда посредством ссылок во всех отношениях.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0225] Данное изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или существенных характеристик. Вышеприведенные варианты реализации, таким образом, должны рассматриваться во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в данном документе. Объем изобретения, таким образом, указывается прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и все изменения, попадающие в смысловое содержание и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны рассматриваться как входящие в его объем.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:
 - (a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;
 - (b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает FLT3; и
 - (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16.
2. Белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт связывается с NKG2D у людей.
3. Белок по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи.
4. Белок по п. 3, отличающийся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи и указанный переменный домен легкой цепи присутствуют в одном и том же полипептиде.
5. Белок по пп. 3 или 4, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи.
6. Белок по п. 5, отличающийся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи и указанный переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта присутствуют в одном и том же полипептиде.
7. Белок по п. 5 или 6, отличающийся тем, что указанный переменный домен легкой цепи первого антигенсвязывающего сайта имеет аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности переменного домена легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта.
8. Белок по любому из предшествующих пунктов формулы, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере, на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85, и SEQ ID NO:93.
9. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:41, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:42.
10. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:49, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:50.
11. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:57, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере

на 90% идентичный SEQ ID NO:58.

12. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:59, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:60.

13. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:61, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:62.

14. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:69, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:70.

15. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:77, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:78.

16. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:85, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:86.

17. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:93, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:94.

18. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:101, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:102.

19. Белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:103, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:104.

20. Белок по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий сайт представляет собой однодоменное антитело.

21. Белок по п. 20, отличающийся тем, что указанное однодоменное антитело представляет собой V_HH-фрагмент или V_{NAR}-фрагмент.

22. Белок по любому из пп. 1-2 или 20-21, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

23. Белок по п. 22, отличающийся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи и указанный переменный домен легкой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта присутствуют в одном и том же полипептиде.

24. Белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3, указанный переменный домен тяжелой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:109, и указанный переменный домен легкой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:113.

25. Белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3, указанный переменный домен тяжелой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:117, и указанный переменный домен легкой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:121.

26. Белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает FLT3, указанный переменный домен тяжелой цепи указанного второго антигенсвязывающего сайта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:125, и указанный переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта содержит указанную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:129.

27. Белок по любому из пп. 1-4 или 8-21, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт представляет собой однодоменное антитело.

28. Белок по п. 27, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий сайт представляет собой V_HH-фрагмент или V_{NAR}-фрагмент.

29. Белок по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, отличающийся тем, что указанный белок содержит часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, причем указанный Fc-домен антитела включает шарнирный и CH2-домены.

30. Белок по п. 29, отличающийся тем, что указанный Fc-домен антитела включает шарнирный и CH2-домены человеческого IgG1 антитела.

31. Белок по п. 29 или 30, отличающийся тем, что указанный Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого IgG1 антитела.

32. Белок по п. 31, отличающийся тем, что указанный Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену человеческого IgG1, и отличается в одной или нескольких позициях, выбранных из

группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411, K439.

33. Композиция, содержащая белок по любому из предшествующих пунктов формулы и фармацевтически приемлемый носитель.

34. Клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, экспрессирующих белок по любому из пп. 1-32.

35. Способ усиления гибели опухолевых клеток, включающий воздействие на опухолевые клетки и естественные клетки-киллеры эффективным количеством белка по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что указанные опухолевые клетки экспрессируют FLT3.

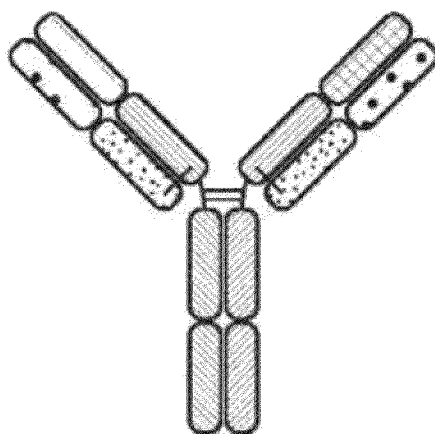
36. Способ лечения рака, отличающийся тем, что указанный способ включает введение пациенту эффективного количества белка по любому из пп. 1-32 или композиции по п. 33.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что рак представляет собой лейкоз.

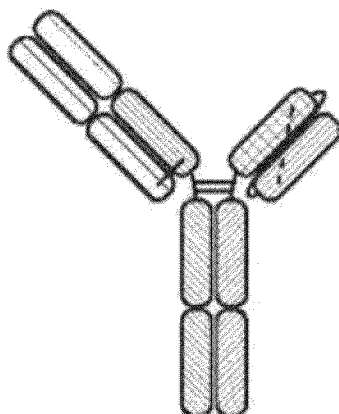
38. Способ лечения рака по п. 37, отличающийся тем, что указанный лейкоз выбирают из группы, состоящий из острого миелолейкоза, Т-клеточного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза и волосатоклеточного лейкоза.

По доверенности

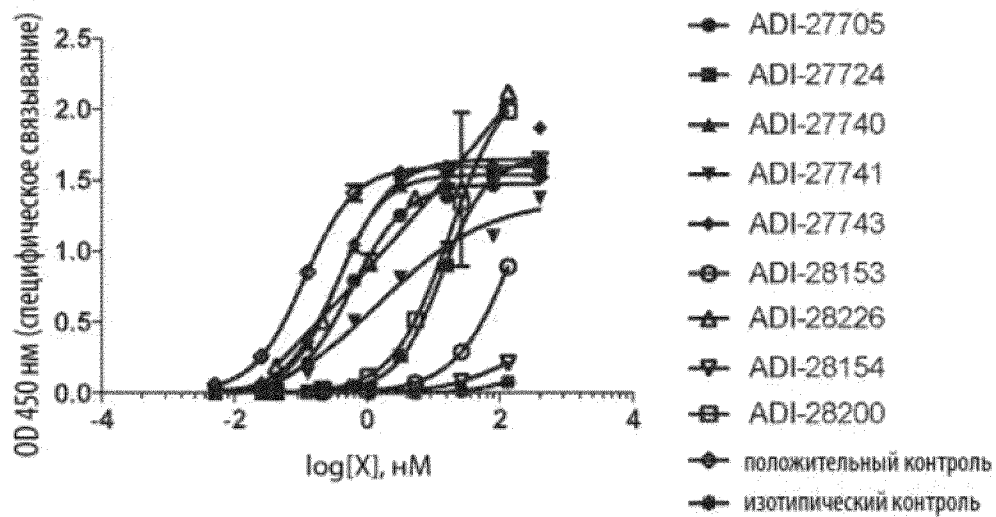
Фиг. 1



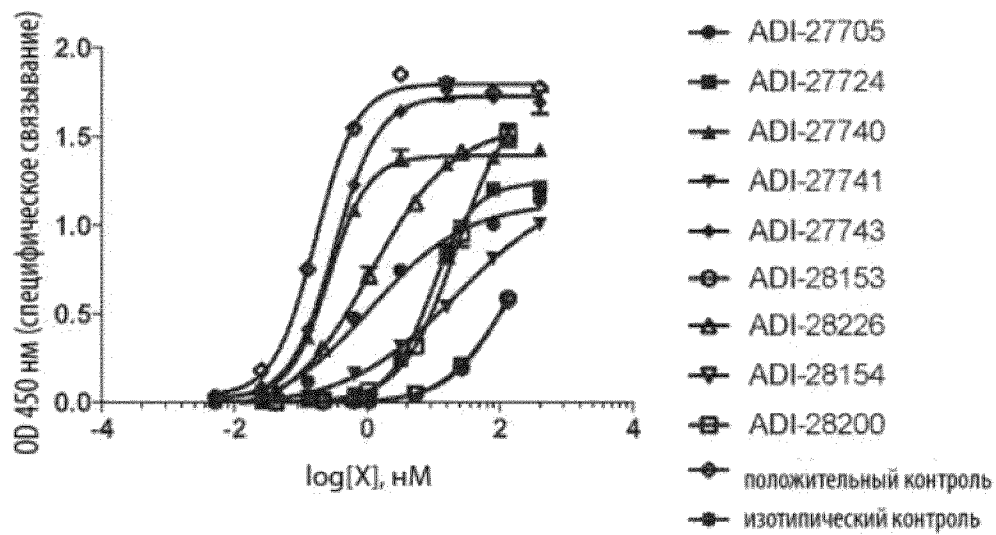
Фиг. 2



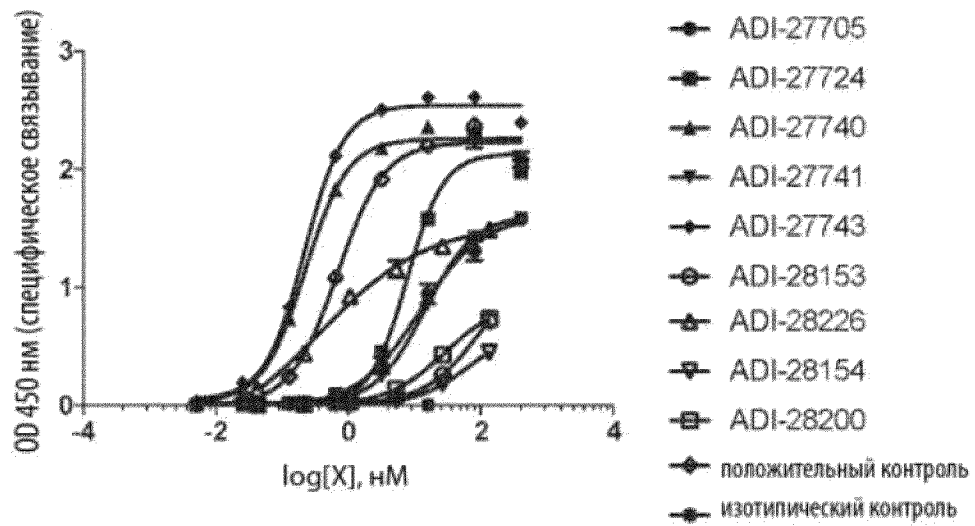
Фиг. 3



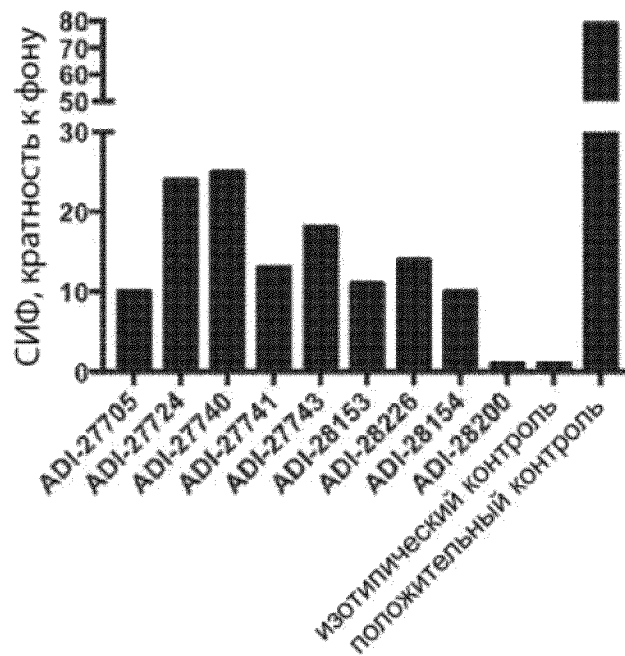
Фиг. 4



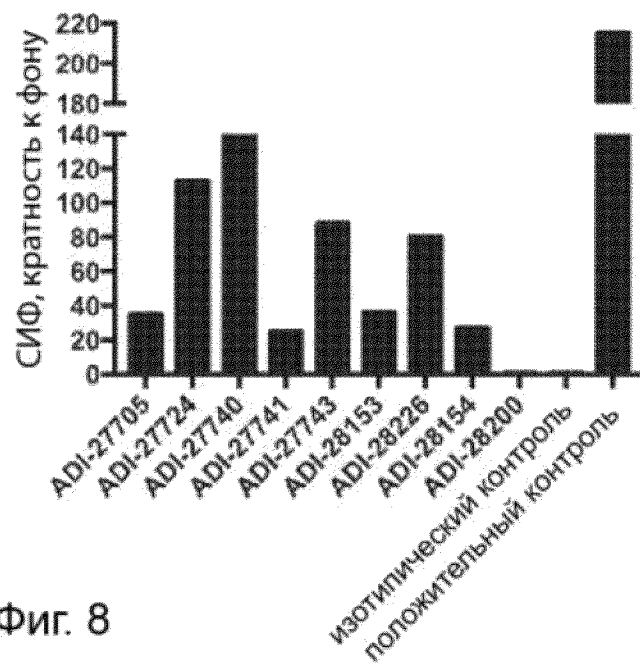
Фиг. 5



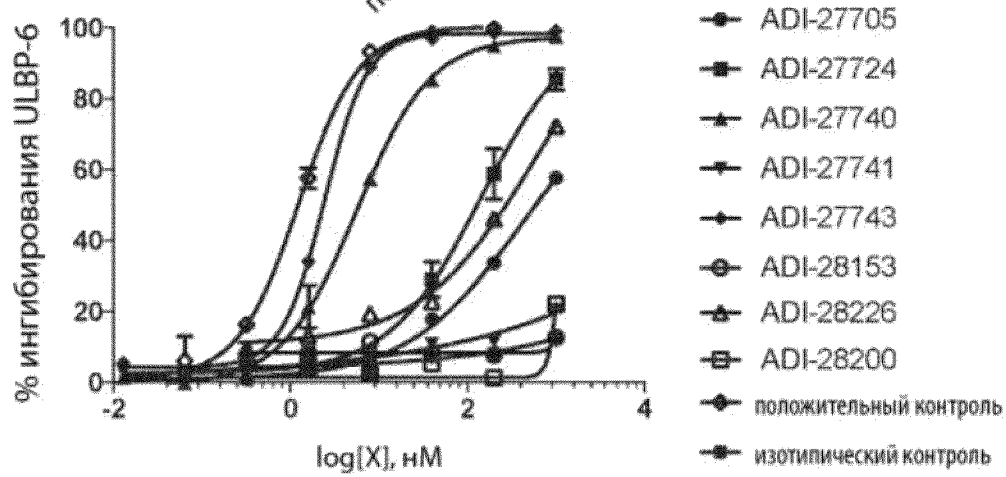
Фиг. 6



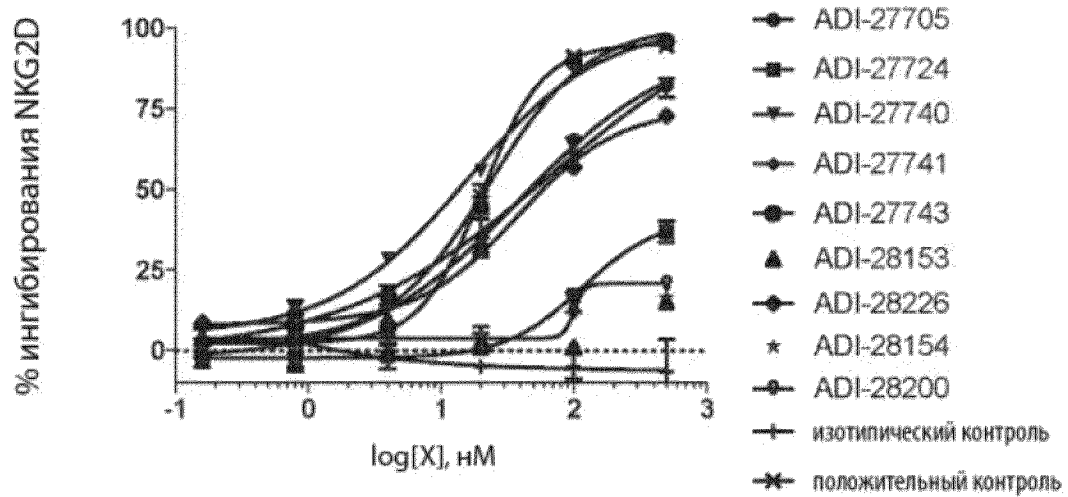
Фиг. 7



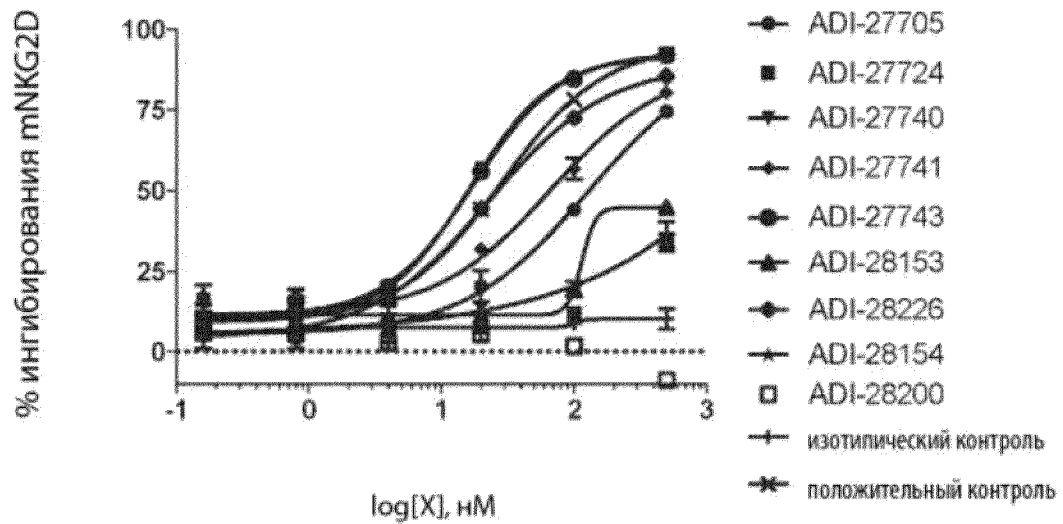
Фиг. 8



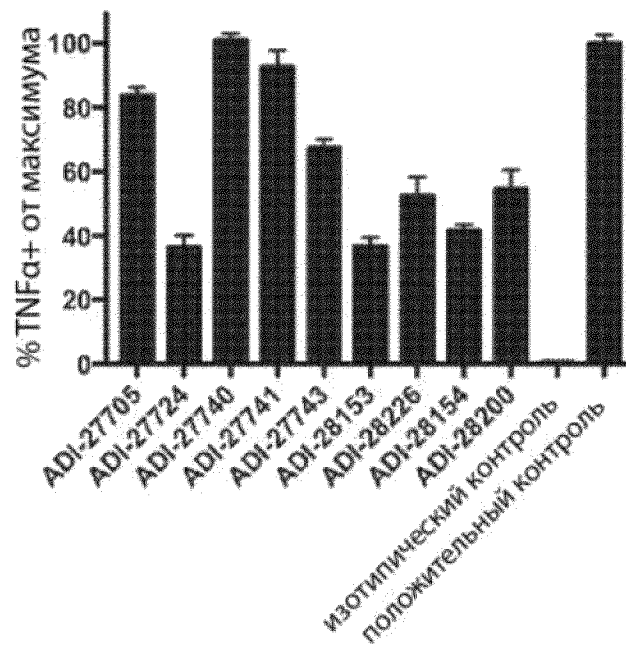
Фиг. 9



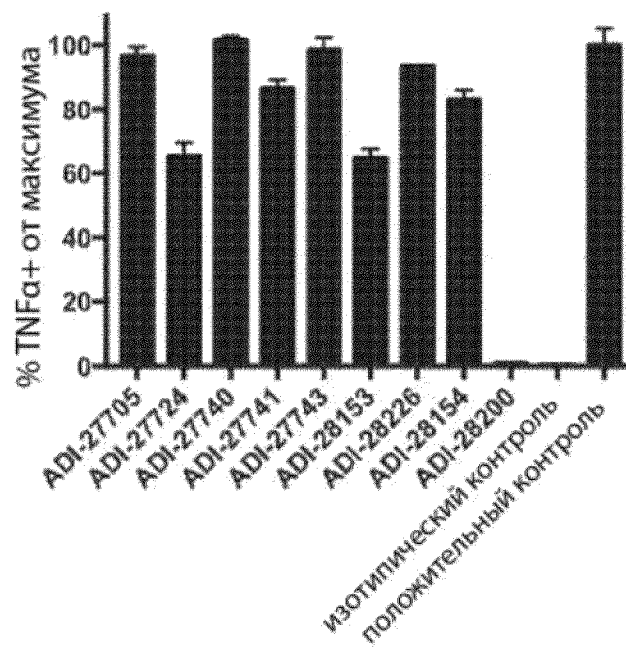
Фиг. 10



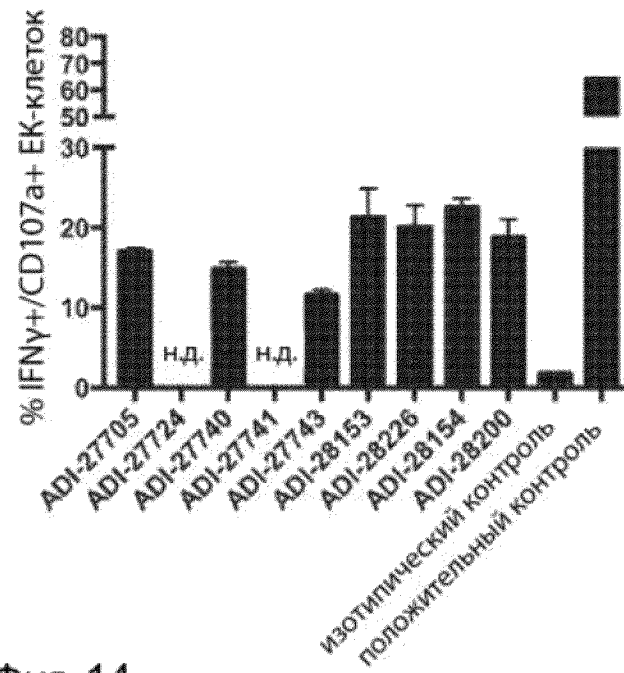
Фиг. 11



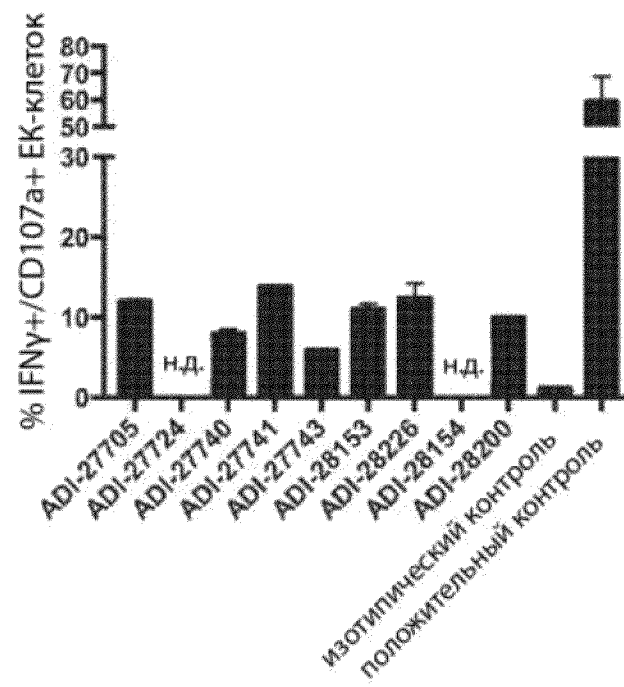
Фиг. 12



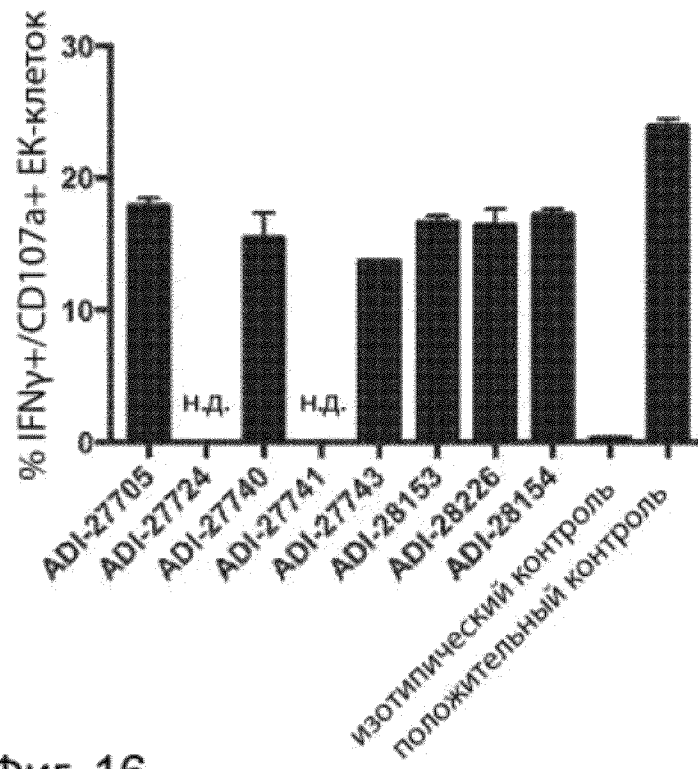
Фиг. 13



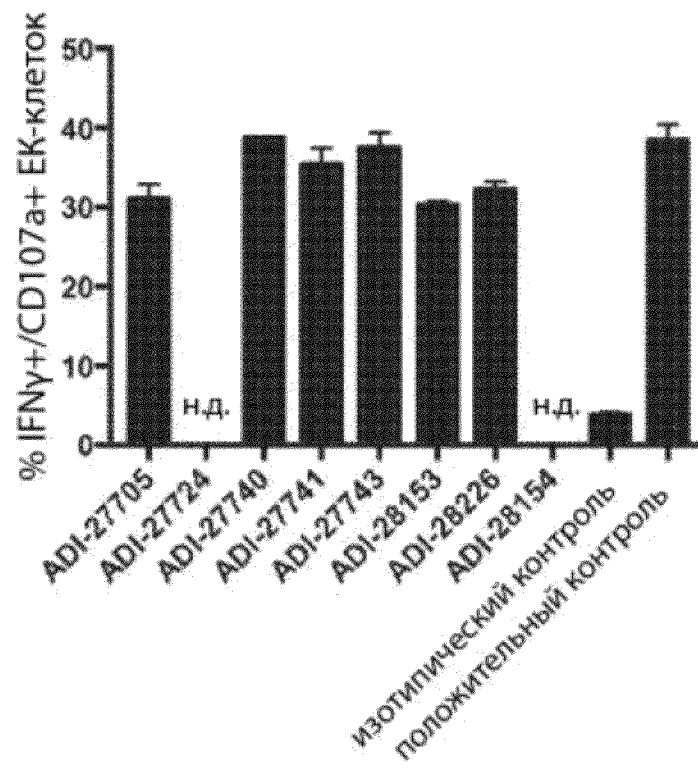
Фиг. 14



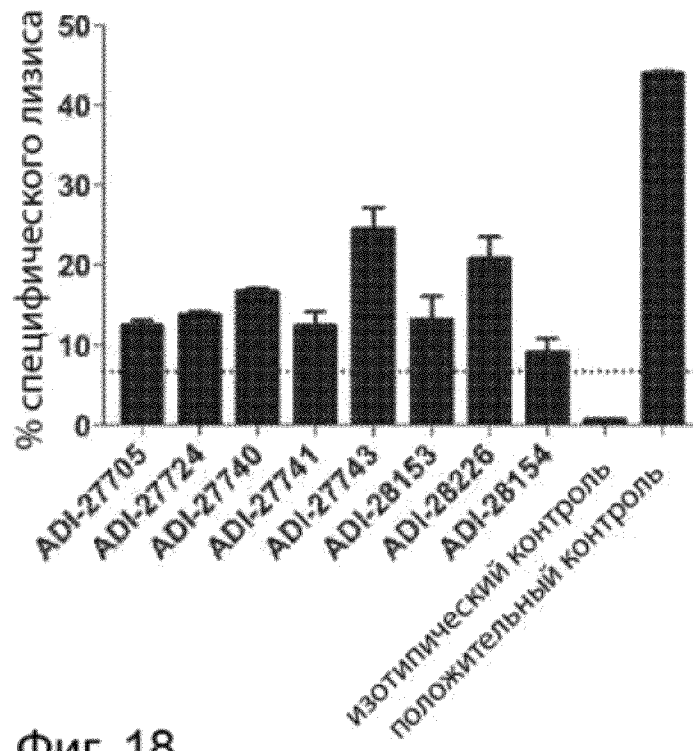
Фиг. 15



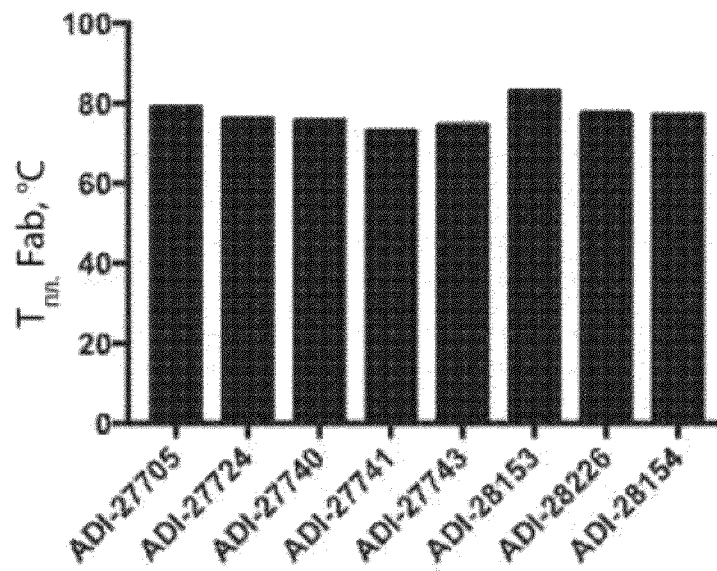
Фиг. 16



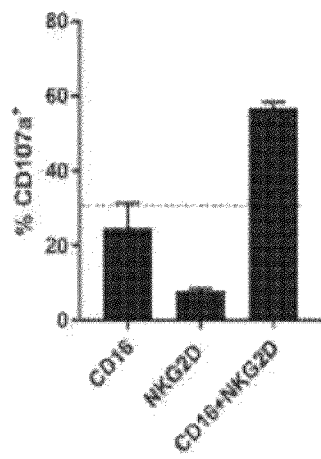
Фиг. 17



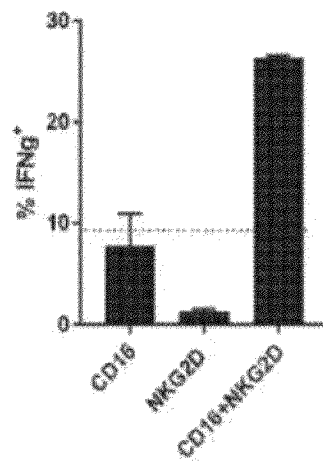
Фиг. 18



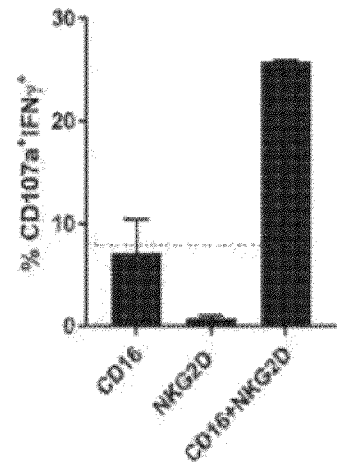
Фиг. 19А



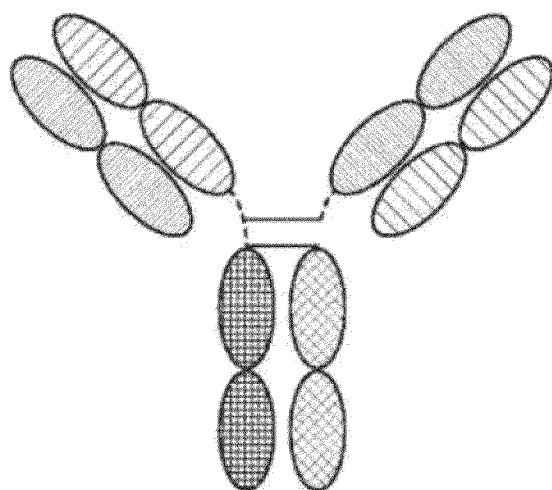
Фиг. 19В



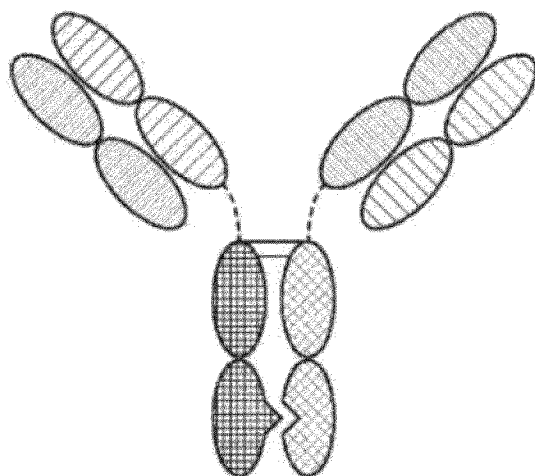
Фиг. 19С



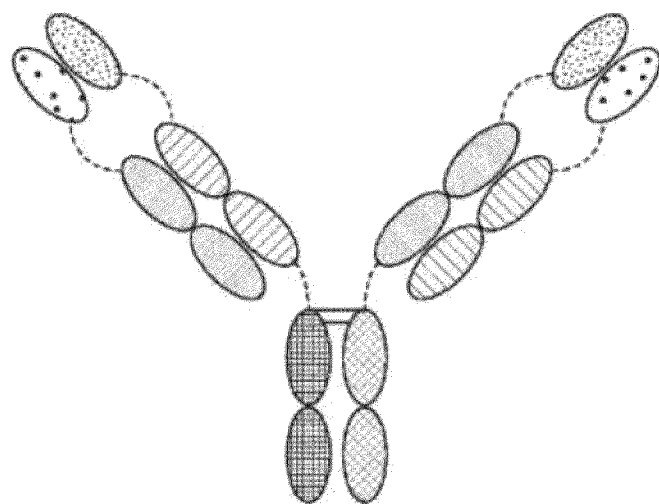
Фиг. 20



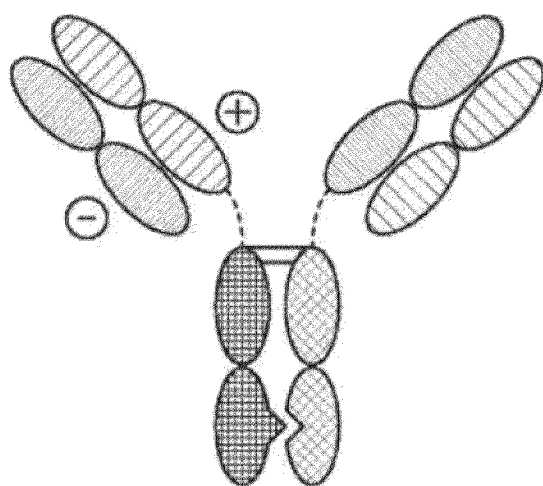
Фиг. 21



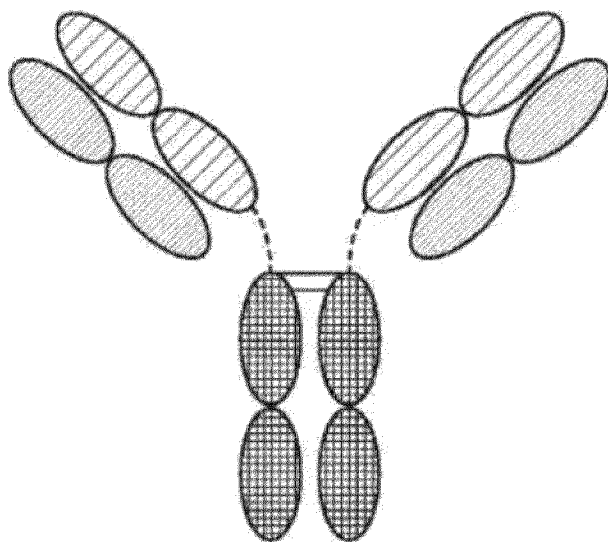
Фиг. 22



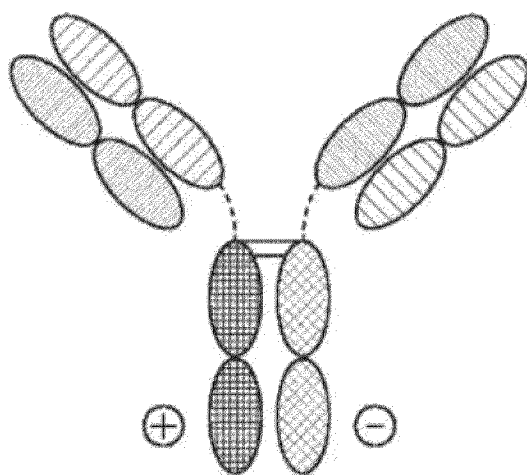
Фиг. 23



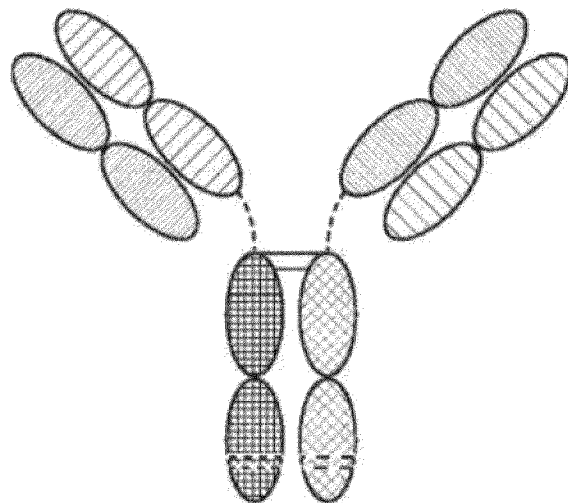
Фиг. 24



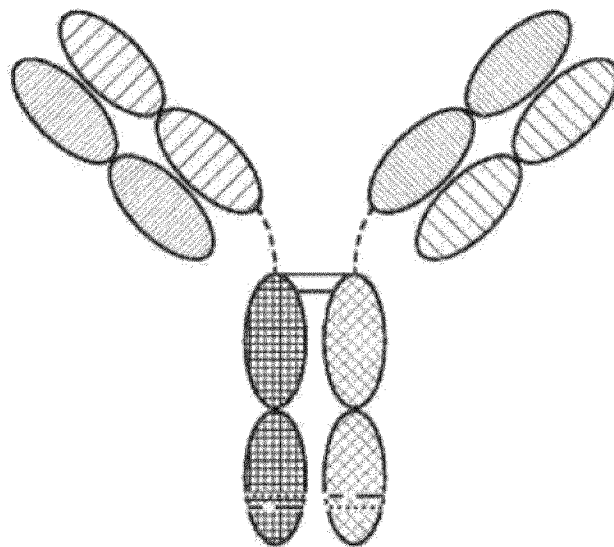
Фиг. 25



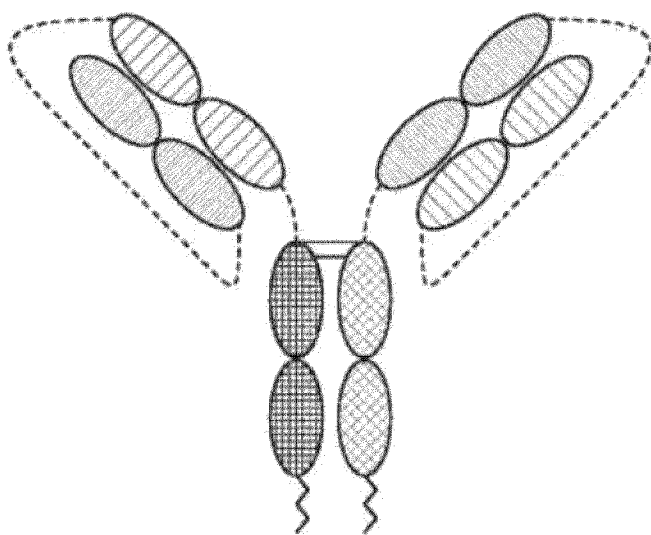
Фиг. 26



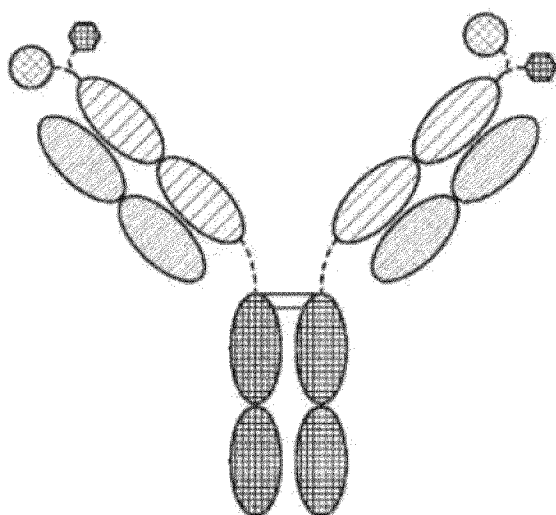
Фиг. 27



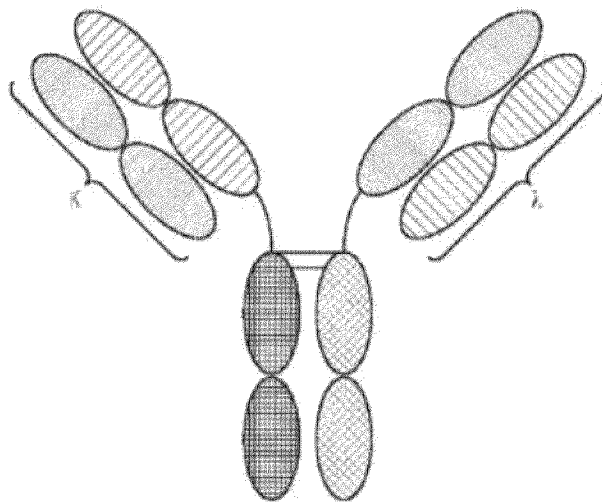
Фиг. 28



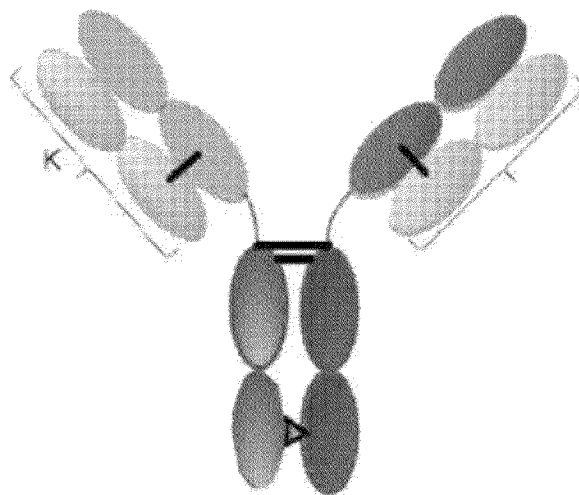
Фиг. 29



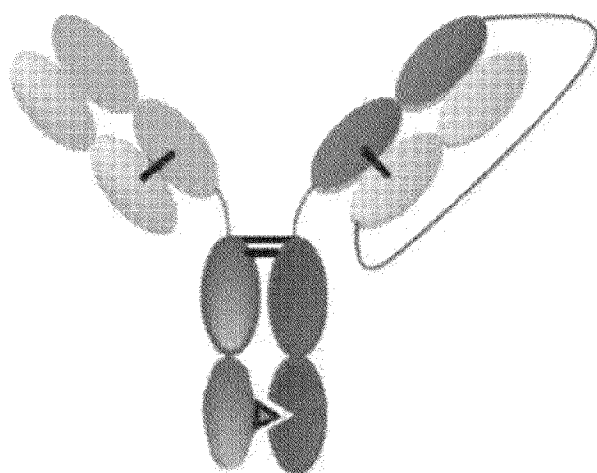
Фиг. 30А



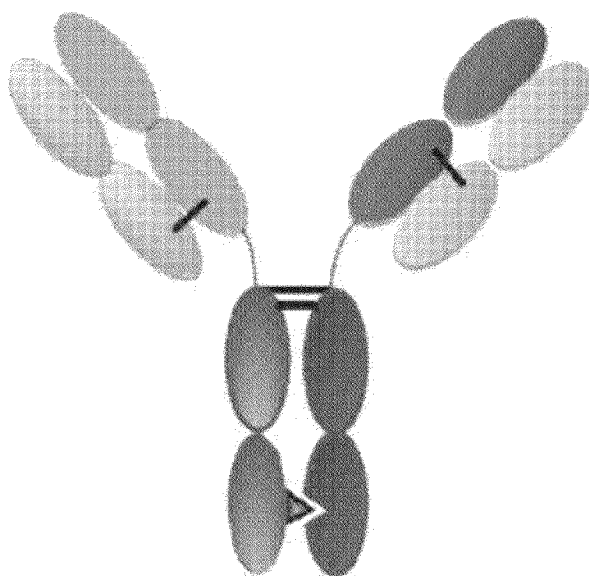
Фиг. 30В



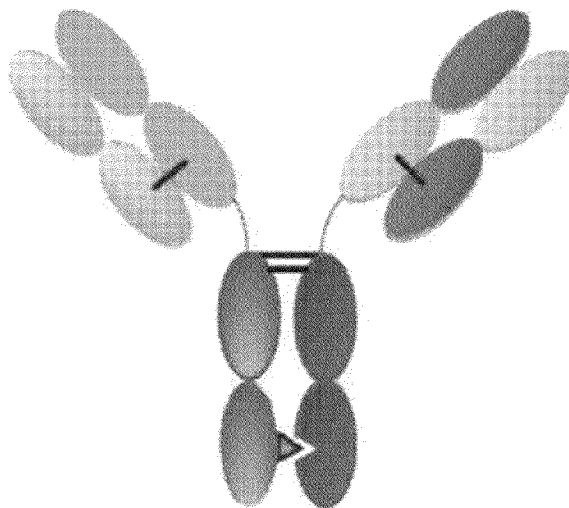
Фиг. 31



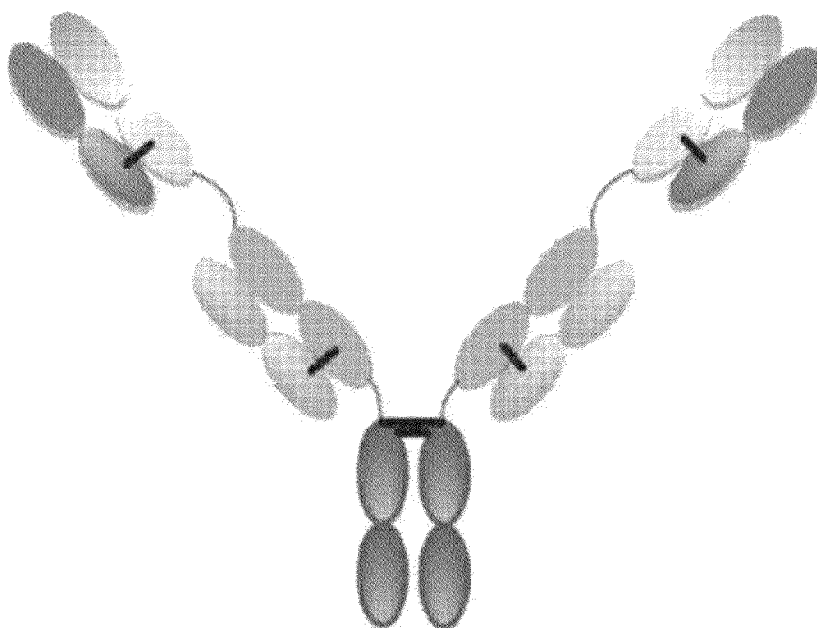
Фиг. 32



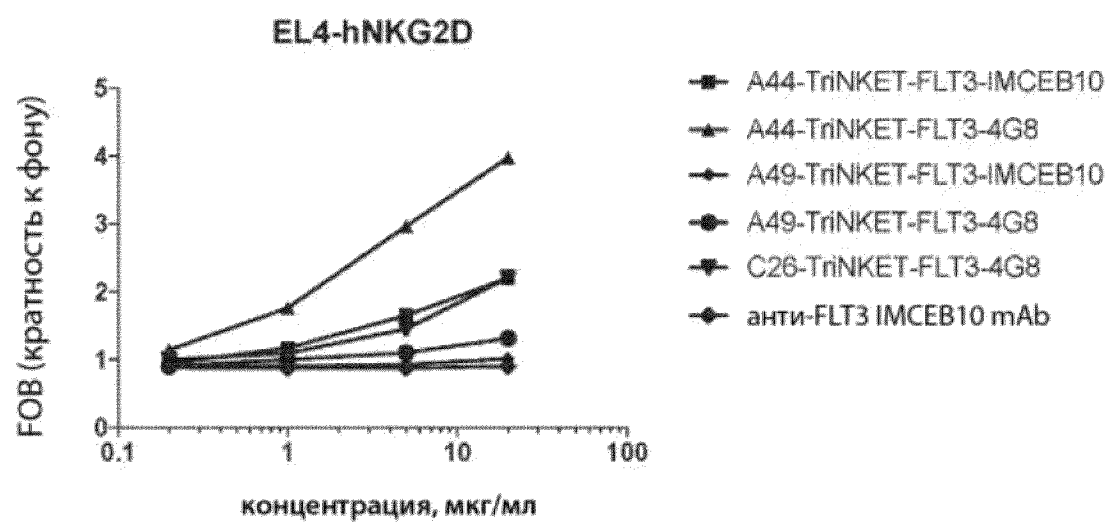
Фиг. 33



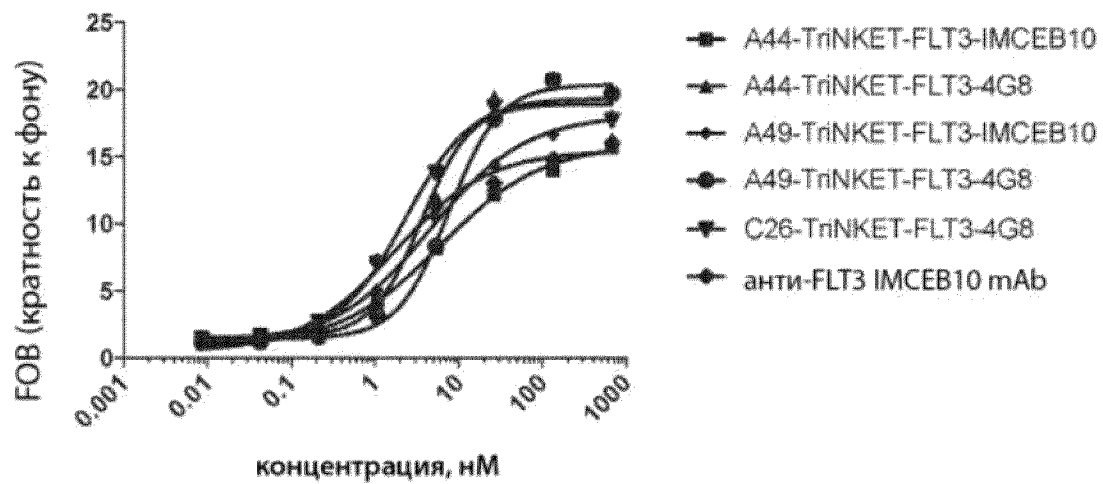
Фиг. 34



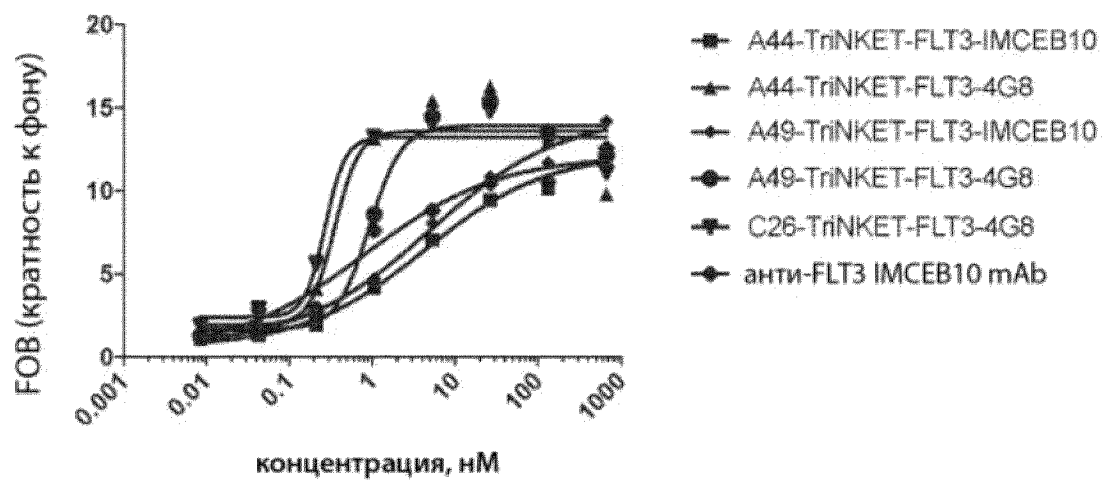
Фиг. 35



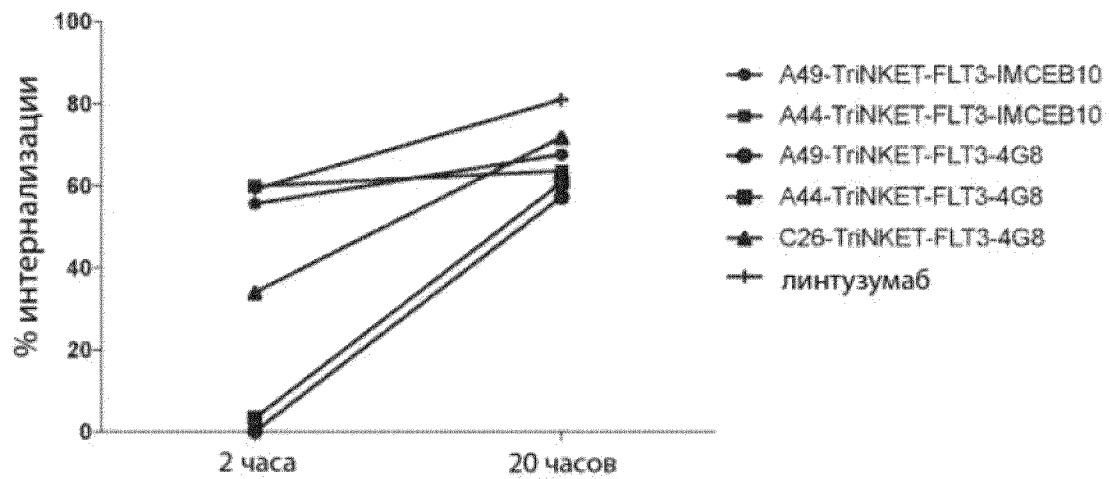
Фиг. 36А



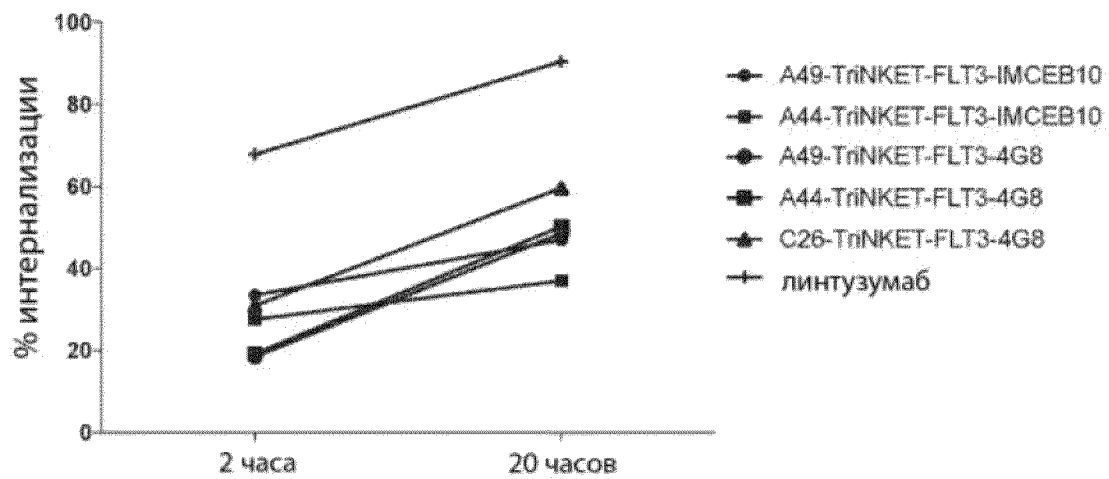
Фиг. 36В



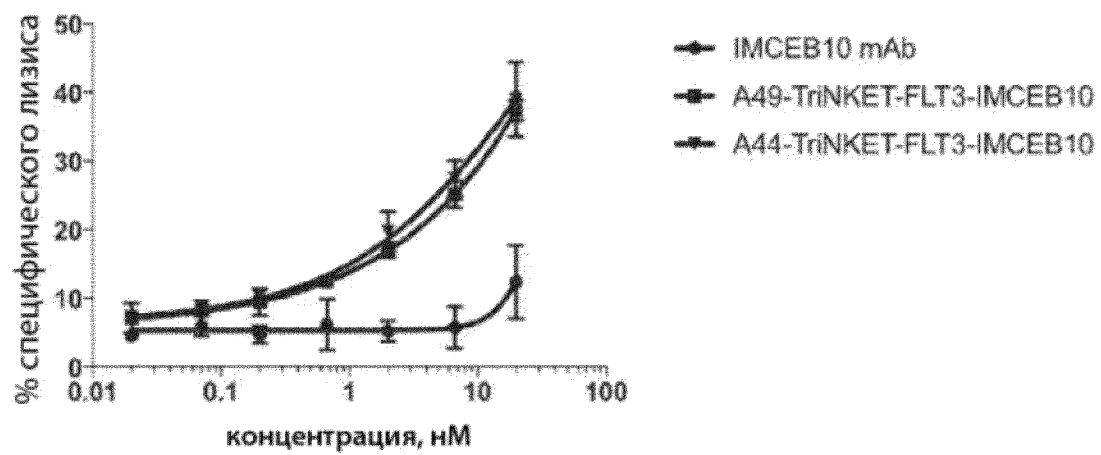
Фиг. 37А



Фиг. 37В



Фиг. 38А



Фиг. 38В

