(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090718 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.01

(22) Дата подачи заявки
2018.09.13

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И ЛЕКТИНОПОДОБНУЮ МОЛЕКУЛУ-1 С-ТИПА (CLL-1)

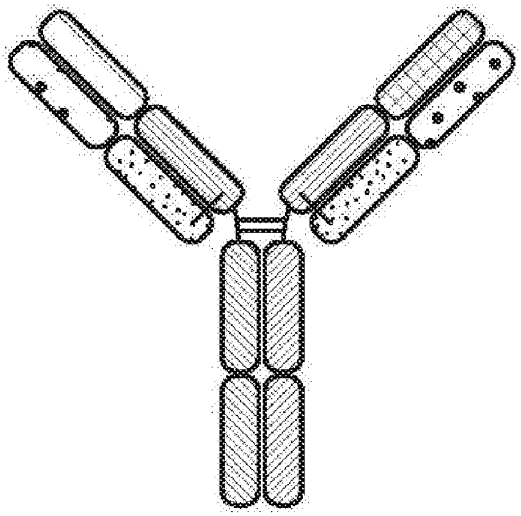
(31) **62/558,510**
(32) **2017.09.14**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/050916**
(87) **WO 2019/055677 2019.03.21**

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

(72) Изобретатель:
Чан Грегори П., Чеунг Энн Ф., Хани Уилльям, Лунде Брэдли М., Принц Бьянка (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с опухолеассоциированным антигеном CLEC12A и с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах. Один аспект настоящего изобретения относится к белку, который включает первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D; второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и Fc-домен антитела, его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16. Каждый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи антитела и вариабельный домен легкой цепи антитела, или один или более антигенсвязывающих участков могут представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело VHH или антитело VNAR. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка.



202090718 A1

202090718 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561985EA/085

БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ NKG2D, CD16 И ЛЕКТИНОПОДОБНУЮ МОЛЕКУЛУ-1 С-ТИПА (CLL-1)

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 62/558510, поданной 14 сентября 2017 года.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная копия в ASCII, созданная 11 сентября 2018 года, называется DFY-041WO_SL.txt и имеет размер 89993 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с NKG2D, CD16 и опухолеасоциированным антигеном лектиноподобной молекулой-1 С-типа (CLL-1).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Рак продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на существенные исследовательские усилия и научные достижения, о которых сообщается в литературе, в отношении лечения этого заболевания. К некоторым из наиболее часто диагностируемых видов рака относятся рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого и колоректальный рак. Рак предстательной железы является наиболее распространенной формой рака у мужчин. Рак молочной железы остается основной причиной смерти у женщин. Также часто диагностируемыми видами рака являются рак крови и костного мозга, включая множественные миеломы, лейкоз и лимфомы. Текущие варианты лечения этих видов рака эффективны не для всех пациентов и/или могут иметь существенные побочные эффекты. Другие виды рака также остаются сложными для лечения с использованием существующих вариантов лечения.

[0005] Иммунотерапия рака желательна, потому что она высокоспецифична и может способствовать разрушению раковых клеток с использованием собственной иммунной системы пациента. Описанная в литературе иммунотерапия рака представляют собой белки слияния, такие как биспецифические рекрутеры Т-клеток, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. В литературе описаны антитела, которые связываются с некоторыми опухолеасоциированными антигенами и с некоторыми иммунными клетками. Смотри, например, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

[0006] Естественные клетки-киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют приблизительно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки проникают практически во все ткани, и их основной характерисикой оказалась способность эффективно убивать опухолевые клетки без необходимости в

предварительной сенсибилизации. Активированные NK-клетки убивают клетки-мишени с помощью средств, аналогичных цитотоксическим Т-клеткам - т.е. с помощью цитолитических гранул, которые содержат перфорин и гранзимы, а также через пути рецепторов смерти. Активированные NK-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN-гамма и хемокины, которые способствуют рекрутингу других лейкоцитов в ткани-мишени.

[0007] NK-клетки реагируют на сигналы через различные активирующие и ингибирующие рецепторы на своей поверхности. Например, когда NK-клетки встречают здоровые аутоклетки, их активность ингибируется активацией иммуноглобулиноподобных рецепторов (KIR) клеток-киллеров. Альтернативно, когда NK-клетки встречают чужеродные клетки или раковые клетки, они активируются через свои активирующие рецепторы (например, NKG2D, NCR, DNAM1). NK-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на своей поверхности. Общая чувствительность NK-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов.

[0008] Ген члена А семейства 12 лектиновых доменов С-типа кодирует член суперсемейства лектиновых/лектиноподобных доменов С-типа (CTL/CTLD). Члены этого семейства имеют одинаковую укладку белка и обладают разнообразными функциями, такими как клеточная адгезия, передача сигналов между клетками, обмен гликопротеинов и исполнение ролей при воспалении и иммунном ответе. Белок, кодируемый этим геном, является негативным регулятором функции гранулоцитов и моноцитов. Человеческая лектиноподобная молекула-1 С-типа (CLL-1), также известная как MICL или CLEC12A, является трансмембранным гликопротеином типа II и членом большого семейства лектиноподобных рецепторов С-типа, участвующих в иммунной регуляции. CLL-1/CLEC12A сверхэкспрессируется у более чем 90% пациентов с острым миелоидным лейкозом на лейкозных стволовых клетках, но не на нормальных гемопоэтических клетках. Настоящее изобретение предлагает мультиспецифические связывающие белки, которые связывают CLL-1/CLEC12A, и применение этих белков в лечении рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с опухолеасоциированным антигеном CLEC12A и с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах. Такие белки могут взаимодействовать с более чем одним типом активирующего NK рецептора и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. Различные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

[0010] Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к белку, который включает первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D; второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLEC12A; и Fc-домен антитела,

его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16. Каждый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи антитела и вариабельный домен легкой цепи антитела (например, расположенные как в антителе или слитые вместе с образованием scFv), или один или более антигенсвязывающих участков могут представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело V_HH, подобное верблюжьему антителу, или антитело V_{NAR}, подобное тем, которые обнаружены у хрящевых рыб.

[0011] Первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, в некоторых вариантах осуществления может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:1, например, иметь 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 включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:105), CDR2 (SEQ ID NO:106) и CDR3 (SEQ ID NO:107) в SEQ ID NO:1. Вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:1, может быть связан с различными вариабельными доменами легкой цепи с образованием участка связывания NKG2D. Например, первый антигенсвязывающий участок, который включает вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:1, может дополнительно включать вариабельный домен легкой цепи, выбранный из последовательностей, родственных SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 и 40. Например, первый антигенсвязывающий участок включает вариабельный 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 вариабельный 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, 38 и 40.

[0012] Альтернативно, первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:41, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:42. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:41 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:44) и CDR3 (SEQ ID NO:45) в SEQ ID NO:41. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:42 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:47) и CDR3 (SEQ ID NO:48) в SEQ ID NO:42.

[0013] В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок

может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:49, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:50. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:49 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:52) и CDR3 (SEQ ID NO:53) в SEQ ID NO:49. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:50 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:55) и CDR3 (SEQ ID NO:56) в SEQ ID NO:50.

[0014] Альтернативно, первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:57, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:58, например, имея 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.

[0015] В другом варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:59, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:60, например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:59 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:109), CDR2 (SEQ ID NO:110) и CDR3 (SEQ ID NO:111) в SEQ ID NO:59. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:60 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:112), CDR2 (SEQ ID NO:113) и CDR3 (SEQ ID NO:114) в SEQ ID NO:60.

[0016] Первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, в некоторых вариантах осуществления может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:61, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:62. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:61 и/или может включают аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64) и CDR3 (SEQ ID NO:65) в SEQ ID NO:61. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по

меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:62 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:66), CDR2 (SEQ ID NO:67) и CDR3 (SEQ ID NO:68) в SEQ ID NO:62.

[0017] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:69, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:70. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:69 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:72) и CDR3 (SEQ ID NO:73) в SEQ ID NO:69. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:70 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:75) и CDR3 (SEQ ID NO:76) в SEQ ID NO:70.

[0018] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:77, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:78. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:77 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:80) и CDR3 (SEQ ID NO:81) в SEQ ID NO:77. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:78 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:82), CDR2 (SEQ ID NO:83) и CDR3 (SEQ ID NO:84) в SEQ ID NO:78.

[0019] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:85, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:86. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:85 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:87), CDR2 (SEQ ID NO:88) и CDR3 (SEQ ID NO:89) в SEQ ID NO:85. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%)

идентичен SEQ ID NO:86 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:90), CDR2 (SEQ ID NO:91) и CDR3 (SEQ ID NO:92) в SEQ ID NO:86.

[0020] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:93, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:94. Например, вариабельный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:93 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:95), CDR2 (SEQ ID NO:96) и CDR3 (SEQ ID NO:97) в SEQ ID NO:93. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:94 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:98), CDR2 (SEQ ID NO:99) и CDR3 (SEQ ID NO:100) в SEQ ID NO:94.

[0021] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:101, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:102, например, иметь 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%) идентичны SEQ ID NO:102, соответственно.

[0022] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий участок может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:103, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:104, например, иметь 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.

[0023] В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок может связываться с CLEC12A и может включать вариабельный домен тяжелой цепи, родственный SEQ ID NO:115, и вариабельный домен легкой цепи, родственный SEQ ID NO:119. Например, вариабельный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:115 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:116), CDR2 (SEQ ID NO:117), и CDR3 (SEQ ID NO:118) в SEQ ID NO:115. Аналогично, вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO:119 и/или может включать аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO:120), CDR2 (SEQ ID NO:121) и CDR3 (SEQ ID NO:122) в SEQ ID NO:119.

[0024] В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок включает вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой цепи, присутствующей в первом антигенсвязывающем участке.

[0025] В некоторых вариантах осуществления белок включает часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, причем Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2 домены и/или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные аминокислотной последовательности 234-332 человеческого антитела IgG.

[0026] Также изобретение относится к композициям, содержащим один из этих белков; клеткам, содержащим одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих эти белки, и способам усиления гибели опухолевых клеток с использованием этих белков.

[0027] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем изобретении. Типичные виды рака для лечения с использованием этих мультиспецифических связывающих белков включают, например, острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфобластный лейкоз (ALL), миелопролиферативные новообразования (MPN), лимфому, неходжкинские лимфомы и классическую ходжкинскую лимфому.

[0028] В некоторых вариантах осуществления подлежащий лечению рак представляет собой AML, выбранный из недифференцированного острого миелобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза с минимальным созреванием, острого миелобластного лейкоза с созреванием, острого промиелоцитарного лейкоза (APL), острого миеломоноцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией, острого моноцитарного лейкоза, острого эритроидного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза (AMKL), острого базофильного лейкоза, острого панмиелоза с фиброзом и бластного плазмацитоидного дендритного клеточного новообразования (BPDCN).

[0029] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой MDS, выбранный из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевидными сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицируемого MDS (MDS-U).

[0030] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению ALL выбирают из B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и T-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL). В вариантах

осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению MPN выбирают из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащую лечению неходжкинскую лимфому выбирают из B-клеточной лимфомы и T-клеточной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащую лечению лимфому выбирают из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), зрелых T/NK-новообразований и гистиоцитарных новообразований.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0031] Фиг. 1 является представлением гетеродимерного мультиспецифического антитела (триспецифический связывающий белок (TriNKET)). Каждое плечо может представлять собой или связывающий NKG2D домен, или связывающий опухолеасоциированный антиген домен. В некоторых вариантах осуществления связывающие NKG2D и опухолеасоциированный антиген домены могут иметь общую легкую цепь.

[0032] Фиг. 2 является представлением гетеродимерного мультиспецифического антитела. Или связывающий NKG2D домен, или связывающий опухолеасоциированный антиген домен могут принимать формат scFv (правое плечо).

[0033] Фиг. 3 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с человеческим рекомбинантным NKG2D в анализе ELISA.

[0034] Фиг. 4 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с рекомбинантным NKG2D яванского макака в анализе ELISA.

[0035] Фиг. 5 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с мышиным рекомбинантным NKG2D в анализе ELISA.

[0036] Фиг. 6 представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие связывание связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с клетками EL4, экспрессирующими человеческий NKG2D, с помощью проточной цитометрии, показывающие повышение средней интенсивности флуоресценции (MFI) относительно фона (FOB).

[0037] Фиг. 7 представляет собой столбчатые диаграммы, демонстрирующие связывание связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с клетками EL4, экспрессирующими мышиный NKG2D, с помощью проточной цитометрии, показывающие повышение средней интенсивности флуоресценции (MFI) относительно фона (FOB).

[0038] Фиг. 8 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие специфическую аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с рекомбинантным человеческим NKG2D-Fc по конкурированию с природным лигандом ULBP-6.

[0039] Фиг. 9 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие специфическую аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с рекомбинантным человеческим NKG2D-Fc по конкурированию с природным лигандом MICA.

[0040] Фиг. 10 представляет собой линейные диаграммы, демонстрирующие специфическую аффинность связывания связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны) с рекомбинантным мышиным NKG2D-Fc по конкурированию с природным лигандом Rae-1-дельта.

[0041] Фиг. 11 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию человеческого NKG2D связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны) по количественной оценке процентной доли TNF-α-положительных клеток, которые экспрессируют белки слияния человеческий NKG2D-CD3-дзета.

[0042] Фиг. 12 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию мышиного NKG2D связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны) по количественной оценке процентной доли TNF-α-положительных клеток, которые экспрессируют белки слияния мышиный NKG2D-CD3-дзета.

[0043] Фиг. 13 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию человеческих NK-клеток связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны).

[0044] Фиг. 14 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию человеческих NK-клеток связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны).

[0045] Фиг. 15 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию мышиных NK-клеток связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны).

[0046] Фиг. 16 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие активацию мышиных NK-клеток связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны).

[0047] Фиг. 17 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие цитотоксический эффект, оказываемый связывающими NKG2D доменами (приведены как клоны) на опухолевые клетки.

[0048] Фиг. 18 представляет собой столбчатые диаграммы, показывающие температуру плавления связывающих NKG2D доменов (приведены как клоны), измеренную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии.

[0049] Фиг. 19A-19C представляет собой столбчатые диаграммы синергетической активации NK-клеток при связывании CD16 и NKG2D. Фиг. 19A демонстрирует уровни

CD107a; фиг. 19B демонстрирует уровни IFN-γ; фиг. 19C демонстрирует уровни CD107a и IFN-γ. Диаграммы показывают среднее (n=2) ±CO. Данные представляют пять независимых экспериментов с использованием пяти разных здоровых доноров.

[0050] Фиг. 20 является представлением триспецифического связывающего белка (TriNKET) в форме Triomab, которое представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител с одной легкой и одной тяжелой цепью каждое, которые происходят от двух родительских антител. Форма Triomab может представлять собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 1/2 крысиного антитела и 1/2 мышиного антитела.

[0051] Фиг. 21 является представлением TriNKET в форме общей легкой цепи KiH, в которой используется технология выступы-во-впадины (KIH). KiH представляет собой гетеродимер, содержащий 2 фрагмента Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. TriNKET в формате KiH может быть гетеродимерной конструкцией с 2 фрагментами Fab, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащей две разные тяжелые цепи и общую легкую цепь, которая спарена с обеими тяжелыми цепями.

[0052] Фиг. 22 является представлением TriNKET в форме иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig™), который объединяет связывающие мишень домены двух моноклональных антител посредством гибких природных линкеров и дает четырехвалентную IgG-подобную молекулу. DVD-Ig™ представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой вариабельный домен, нацеленный на антиген 2, слит с N-концом вариабельного домена фрагмента Fab, нацеленного на антиген 1. Форма DVD-Ig™ содержит нормальный Fc.

[0053] Фиг. 23 является представлением TriNKET в форме ортогонального интерфейса Fab (Ortho-Fab), который представляет собой гетеродимерную конструкцию, которая содержит 2 фрагмента Fab, связывающиеся с мишенью 1 и мишенью 2, слитые с Fc. Спаривание легкая цепь (LC)-тяжелая цепь (HC) обеспечивается ортогональным интерфейсом. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[0054] Фиг. 24 является представлением TriNKET в формате 2-в-1 Ig.

[0055] Фиг. 25 является представлением TriNKET в форме ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два различных фрагмента Fab, связывающиеся с мишенью 1 и мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями электростатического наведения в Fc.

[0056] Фиг. 26 является представлением TriNKET в форме с обменом фрагментами Fab: антитела, которые обмениваются плечами Fab путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекула) на пару тяжелая-легкая цепь от другой молекулы, что приводит к биспецифическим антителам. Форма с обменом фрагментами Fab (cFAE) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 фрагмента Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации.

[0057] Фиг. 27 является представлением TriNKET в форме SEEDBody, которая представляет собой гетеродимер, содержащий 2 фрагмента Fab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации.

[0058] Фиг. 28 является представлением TriNKET в форме LuZ-Y, в которой для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC используется лейциновая застежка. Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий два разных scFab, связывающиеся с мишенями 1 и 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается благодаря мотивам лейциновой застежки, слитыми с С-концом Fc.

[0059] Фиг. 29 является представлением TriNKET в форме Cov-X-Body.

[0060] Фиг. 30A и 30B являются представлениями TriNKET в формах κλ-Body, которые представляют собой гетеродимерные конструкции с двумя разными фрагментами Fab, слитыми с Fc, стабилизированные мутациями гетеродимеризации: один фрагмент Fab, нацеленный на антиген 1, содержит LC каппа, и второй фрагмент Fab, нацеленный на антиген 2, содержит LC лямбда. Фиг. 30A представляет собой типичное представление одной формы κλ-Body; фиг. 30B представляет собой типичное представление другого κλ-Body.

[0061] Фиг. 31 представляет собой гетеродимерную конструкцию Oasc-Fab, которая включает фрагмент Fab, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, причем оба слиты с Fc-доменом. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc-домене.

[0062] Фиг. 32 представляет собой DuetMab, который представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два различных фрагмента Fab, связывающиеся с антигенами 1 и 2, и Fc, который стабилизирован мутациями гетеродимеризации. Фрагменты Fab 1 и 2 содержат различные мостики S-S, которые обеспечивают корректное спаривание легкой цепи и тяжелой цепи.

[0063] Фиг. 33 представляет собой CrossmAb, который представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя различными фрагментами Fab, связывающимися с мишенями 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Домены CL и CH1 и домены VH и VL меняются, например CH1 линейно слит с VL, тогда как CL линейно слит с VH.

[0064] Фиг. 34 представляет собой Fit-Ig, который представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой фрагмент Fab, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC фрагмента Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

[0065] Фиг. 35 представляет собой линейные диаграммы, показывающие связывание нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A) и моноклонального анти-CLEC12A антитела с линией человеческих клеток AML SKM-1, экспрессирующих CLEC12A.

[0066] Фиг. 36 представляет собой линейные диаграммы, показывающие связывание нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A) и

моноклонального анти-CLEC12A антитела с линией человеческих клеток AML U937, экспрессирующих CLEC12A.

[0067] Фиг. 37 представляет собой линейные диаграммы, показывающие связывание нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A) и моноклонального анти-CLEC12A антитела с клетками EL4, экспрессирующими человеческий NKG2D.

[0068] Фиг. 38 представляет собой линейные диаграммы, показывающие интернализацию нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A), анти-CLEC12A антитела и анти-CD33 антитела линтузумаб на клетках HL60.

[0069] Фиг. 39 представляет собой линейные диаграммы, показывающие интернализацию нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A), анти-CLEC12A антитела и анти-CD33 антитела линтузумаб на клетках SKM-1.

[0070] Фиг. 40 представляет собой линейные диаграммы, показывающие интернализацию нацеленных на CLEC12A TriNKET (например, A49-TriNKET-CLEC12A), анти-CLEC12A антитела и анти-CD33 антитела линтузумаб на клетках U937.

[0071] Фиг. 41 представляет собой линейные диаграммы, показывающие, что нацеленные на CLEC12A TriNKET опосредуют уничтожение первичными человеческими NK-клетками клеток-мишеней HL60. Контрольными антителами являются моноклональное анти-CLEC12A антитело и неспецифический TriNKET (например, TriNKET, который не нацелен на CLEC12A).

[0072] Фиг. 42 представляет собой линейные диаграммы, показывающие, что нацеленные на CLEC12A TriNKET опосредуют уничтожение первичными человеческими NK-клетками клеток-мишеней Mv4-11. Контрольными антителами являются моноклональное анти-CLEC12A антитело и неспецифический TriNKET (например, TriNKET, который не нацелен на CLEC12A).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0073] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связывают CLEC12A на раковой клетке и рецептор NKG2D и рецептор CD16 на естественных клетках-киллерах для активации естественных клеток-киллеров, фармацевтическим композициям, содержащим такие мультиспецифические связывающие белки, и способам лечения с использованием таких мультиспецифических белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака. Различные аспекты настоящего изобретения изложены в разделах ниже; однако аспекты настоящего изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не ограничиваются каким-либо конкретным разделом.

[0074] Для облегчения понимания настоящего изобретения ряд терминов и фраз определены ниже.

[0075] Термины в единственном числе при использовании в настоящем изобретении означает "один или более" и включают множественное число, если из контекста не следует иное.

[0076] При использовании в настоящем изобретении термин "антигенсвязывающий участок" относится к части иммуноглобулиновой молекулы, которая участвует в связывании антигена. В человеческих антителах антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три высоко дивергентных участка в V-областях тяжелой и легкой цепей называются "гипервариабельными областями", которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом находятся между гипервариабельными областями в иммуноглобулинах и рядом с ними. В молекуле человеческого антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельных области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, а три гипервариабельные области каждой из тяжелых и легких цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". У некоторых животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий участок образован одной цепью антител, что дает "однодоменное антитело". Антигенсвязывающие участки могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, который сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, использующем пептидный линкер для соединения вариабельного домена тяжелой цепи с вариабельным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

[0077] Термин "опухолеасоциированный антиген" при использовании в настоящем изобретении означает любой антиген, включая, но без ограничения, белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, который связан с раком. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например в асоциированных с опухолью кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах.

[0078] При использовании в настоящем изобретении термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащий лечению с помощью способов и композиций, описанных в настоящем изобретении. Такие организмы, предпочтительно, включают, но без ограничения, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и т.п.), и более предпочтительно, включают людей.

[0079] При использовании в настоящем изобретении термин "эффективное количество" относится к количеству соединения (например, соединения настоящего изобретения), достаточному для получения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений, применений или дозировок, и не предполагается, что оно ограничено конкретными композицией или способом введения. При использовании в настоящем изобретении

термин "лечение" включает любой эффект, например уменьшение, снижение, модуляцию, ослабление или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, нарушения и т.п., или ослаблению их симптома.

[0080] При использовании в настоящем изобретении термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного средства с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения in vivo или ex vivo.

[0081] При использовании в настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих средств. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Для примеров носителей, стабилизаторов и адъювантов смотри, например, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[0082] При использовании в настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислой или основной) соединения настоящего изобретения, которая при введении субъекту способна обеспечивать соединение настоящего изобретения или его активный метаболит или остаток. Как известно специалистам в данной области техники, "соли" соединений согласно настоящему изобретению могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, но без ограничения, соляную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, 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 по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы при получении солей, полезных в качестве промежуточных соединений при получении настоящего изобретения и их фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты.

[0083] Примеры оснований включают, но без ограничения, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы NW_4^+, где W представляет собой C_{1-4} алкил, и т.п.

[0084] Примеры солей включают, но без ограничения: ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флюкогептаноат, 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, ундеканоат и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений согласно

настоящему изобретению, соединенные с подходящим катионом, таким как Na^+, NH_4^+ и NW_4^+ (где W представляет собой C_{1-4} алкильную группу) и т.п.

[0085] Для терапевтического применения соли соединений согласно настоящему изобретению рассматриваются как фармацевтически приемлемые. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут находить применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

[0086] На протяжении описания, если композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или если процессы и способы описаны как имеющие или включающие конкретные стадии, предполагается, что дополнительно существуют композиции согласно настоящему изобретению, которые состоят по существу или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим изобретением, которые состоят по существу или состоят из перечисленных стадий обработки.

[0087] В основном, в композициях процентная доля указана по весу, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то преимущество имеет предыдущее определение переменной.

I. Белки

[0088] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах и опухолеасоциированным антигеном CLEC12A. Мультиспецифические связывающие белки полезны в фармацевтических композициях и способах лечения, описанных в настоящем изобретении. Связывание мультиспецифических связывающих белков с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на естественной клетке-киллере усиливает активность естественной клетки-киллера в отношении разрушения опухолевых клеток, экспрессирующих опухолеасоциированный антиген CLEC12A. Связывание мультиспецифических связывающих белков с экспрессирующими опухолеасоциированный антиген клетками приближает раковые клетки к естественной клетке-киллеру, что облегчает прямое и косвенное разрушение раковых клеток естественной клеткой-киллером. Дальнейшее описание некоторых типичных мультиспецифических связывающих белков приведено ниже.

[0089] Первый компонент мультиспецифических связывающих белков связывается с экспрессирующими рецептор NKG2D клетками, к которым можно отнести, но без ограничения, NK-клетки, γδ-Т-клетки и $CD8^+$ αβ-Т-клетки. При связывании NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать связывание с NKG2D и активацию рецепторов NKG2D природными лигандами, такими как ULBP6 (связывающий UL16 белок 6) и MICA (родственная цепи главного комплекса гистосовместимости класса I последовательность A).

[0090] Второй компонент мультиспецифических связывающих белков связывает опухолеасоциированный антиген CLEC12A. Экспрессирующие опухолеасоциированный

антиген клетки, которые могут быть обнаружены при лейкозах, таких как, например, острый миелоидный лейкоз и Т-клеточный лейкоз.

[0091] Третий компонент для мультиспецифических связывающих белков связывается с клетками, экспрессирующими CD16, Fc-рецептор на поверхности лейкоцитов, включая естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

[0092] Мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем изобретении, могут иметь различные форматы. Например, одним форматом является гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее в себя первую иммуноглобулиновую тяжелую цепь, первую иммуноглобулиновую легкую цепь, вторую иммуноглобулиновую тяжелую цепь и вторую иммуноглобулиновую легкую цепь (фиг. 1). Первая иммуноглобулиновая тяжелая цепь включает первый домен Fc (шарнир-CH2-CH3), первый вариабельный домен тяжелой цепи и, необязательно, первый домен CH1 тяжелой цепи. Первая иммуноглобулиновая легкая цепь включает первый вариабельный домен легкой цепи и первый константный домен легкой цепи. Первая иммуноглобулиновая легкая цепь вместе с первой иммуноглобулиновой тяжелой цепью образуют антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D. Вторая иммуноглобулиновая тяжелая цепь содержит второй домен Fc (шарнир-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и, необязательно, второй домен CH1 тяжелой цепи. Вторая иммуноглобулиновая легкая цепь включает второй вариабельный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи. Вторая иммуноглобулиновая легкая цепь вместе со второй иммуноглобулиновой тяжелой цепью образуют антигенсвязывающий участок, который связывает опухолеасоциированный антиген CLEC12A. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (фиг. 1). В некоторых вариантах осуществления первая иммуноглобулиновая легкая цепь идентична второй иммуноглобулиновой легкой цепи.

[0093] Другой типичный формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, включающее в себя первую иммуноглобулиновую тяжелую цепь, вторую иммуноглобулиновую тяжелую цепь и иммуноглобулиновую легкую цепь (фиг. 2). Первая иммуноглобулиновая тяжелая цепь включает первый домен Fc (шарнир-CH2-CH3), слитый или через линкер, или через шарнир антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), состоящим из вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, которые спариваются и связывают NKG2D или связывают опухолеасоциированный антиген CLEC12A. Вторая иммуноглобулиновая тяжелая цепь включает второй домен Fc (шарнир-CH2-CH3), второй вариабельный домен тяжелой цепи и, необязательно, домен CH1 тяжелой цепи. Иммуноглобулиновая легкая цепь включает вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вторая иммуноглобулиновая тяжелая цепь спаривается с иммуноглобулиновой легкой цепью и связывается с NKG2D или связывает CLEC12A. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (фиг. 2).

[0094] Один или более дополнительных связывающих мотивов могут быть слиты с С-концом домена CH3 константной области, необязательно через линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий мотив представляет собой одноцепочечную или дисульфид-стабилизированную вариабельную область (scFv), образующую четырехвалентную или трехвалентную молекулу.

[0095] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму Triomab, которая представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, сохраняющее IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител с одной легкой и одной тяжелой цепью каждое, которые происходят от двух родительских антител.

[0096] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму общей легкой цепи (LC) KiH, в которой используется технология выступы-во-впадины (KIH). KIH включает конструирование доменов C_H3 для создания или "выступа", или "впадины" в каждой тяжелой цепи для облегчения гетеродимеризации. Концепция технологии Fc "выступы-во-впадины (KiH)" заключается в том, чтобы вводить "выступ" в один домен CH3 (CH3A) путем замены небольшого остатка на громоздкий (например, $T366W_{CH3A}$ в нумерации EU). Для размещения "выступа" создают комплементарную поверхность "впадины" на другом домене CH3 (CH3B) путем замены ближайших к выступу соседних остатков на меньшие (например, $T366S/L368A/Y407V_{CH3B}$). Мутацию "впадины" оптимизировали с помощью скрининга со структурно-управляемой фаговой библиотекой (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). X-ray crystal structures of KiH Fc variants (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), продемонстрировавшаго, что гетеродимеризация термодинамически поддерживается гидрофобными взаимодействиями, обусловленными стерической комплементарностью на границе между ядрами доменов CH3, тогда как границы выступ-выступ и впадина-впадина не способствуют гомодимеризации из-за стерического несоответствия и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

[0097] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig™), который объединяет связывающие мишень домены двух моноклональных антител посредством гибких природных линкеров и дает четырехвалентную IgG-подобную молекулу.

[0098] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму ортогонального интерфейса Fab (Ortho-Fab). В подходе ortho-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) основанное на структуре конструирование областей вводит комплементарные мутации на границе LC и HC_{VH-CH1} только в один фрагмент Fab без каких-либо изменений в другом фрагменте Fab.

[0099] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет формат 2-в-1 Ig. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два различных фрагмента Fab, связывающиеся с мишенью 1 и мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями электростатического наведения в Fc.

[0100] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму κλ-Body, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя разными фрагментами Fab, слитыми с Fc, стабилизированные мутациями гетеродимеризации: фрагмент 1 Fab, нацеленный на антиген 1, содержит каппа LC, тогда как второй фрагмент Fab, нацеленный на антиген 2, содержит лямбда LC. Фиг. 30A представляет собой типичное представление одной формы κλ-Body; фиг. 30B представляет собой типичное представление другого κλ-Body.

[0101] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму с обменом фрагментами Fab (антитела, которые обмениваются плечами Fab путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекула) на пару тяжелая-легкая цепь от другой молекулы, что приводит к биспецифическим антителам).

[0102] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму SEEDBody. Платформа сконструированных путем обмена между цепями доменов (SEED) была разработана для генерирования асимметричных и биспецифичных антителоподобных молекул, что расширяет возможности терапевтического применения природных антител. Эта платформа сконструированных белков основана на обмене структурно родственных последовательностей иммуноглобулина в консервативных доменах CH3. Конструкция SEED позволяет эффективно генерировать гетеродимеры AG/GA, в то же время препятствуя гомодимеризации доменов SEED CH3 AG и GA. (Muda M. et al., Protein Eng. Des. Sel. (2011, 24(5):447-54)).

[0103] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму LuZ-Y, в которой для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC используется лейциновая застежка. (Wranik, BJ. et al., J. Biol. Chem. (2012), 287:43331-9).

[0104] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму Cov-X-Body. В биспецифических CovX-Body два разных пептида соединены вместе с использованием разветвленного азетидинонового линкера и слиты с

каркасным антителом в мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры отвечают за функциональную активность, каркас из антитела обеспечивает длительный период полужизни и Ig-подобное распределение. Фармакофоры могут быть химически оптимизированы или заменены другими фармакофорами для получения оптимизированных или уникальных биспецифических антител. (Doppalapudi VR et al., PNAS (2010), 107(52);22611-22616).

[0105] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет гетеродимерную форму Oasc-Fab, которая включает фрагмент Fab, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[0106] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую два различных фрагмента Fab, связывающиеся с антигенами 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. Фрагменты Fab 1 и 2 содержат различные мостики S-S, которые обеспечивают корректное спаривание LC и HC.

[0107] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с двумя различными фрагментами Fab, связывающимися с мишенями 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированным гетеродимеризацией. Домены CL и CH1 и домены VH и VL меняются, например CH1 линейно слит с VL, тогда как CL линейно слит с VH.

[0108] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет форму Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерную конструкция, в которой фрагмент Fab, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC фрагмента Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

[0109] В таблице 1 приведены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных 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 NK-клетки.

Таблица 1		
Клон	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYNSYPITFG GGTKVEIK

	(SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:105) - GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:106) - EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:107) - ARARGPWSFDP	(SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYHSFYTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQSNSYYTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYNSYPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRT SQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTF

	CARARGPWGFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:11)	GQGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY

	WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:23)	KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYGSFPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI- 29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYQSFPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI- 29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYSSFSTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI- 29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYESYSTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI- 29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYDSFITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI- 29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYQSYPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA

29426	VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)	SQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYHSFPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI- 29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYELYSYTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI- 29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCQQYDTFITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI- 27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGDSSIRHAYYYYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 (SEQ ID NO:43) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:44) - GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:45) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS SQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPITFGGGTKVEIK (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)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARGSDRFHPYFDYWGQGTLVTV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFGG GTKVEIK

	SS (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:51) - GSISSSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO:52) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:53) - ARGSDRFHPYFDY	(SEQ ID NO:50) CDR1 (SEQ ID NO:54) - RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:55) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:56) - QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:58)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARRGRKASGSFYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO:109) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:110) - GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:111) - ARRGRKASGSFYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCES SQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQ PPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND YSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:60) CDR1 (SEQ ID NO:112) - ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:113) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:114) - QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGAPNYGDTTHDYYYMD VWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:61) CDR1 (SEQ ID NO:63) -	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA

	YTFTSYYMH CDR2 (SEQ ID NO:64) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV	CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QQYDDWPFT
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARDTGEYYDTDDHGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:69) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTGYYMH CDR2 (SEQ ID NO:72) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:73) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFG GGTKVEIK (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)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDGGYYDSGAGDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:77) CDR1 (SEQ ID NO:79) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:81) - AKDGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA SQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:82) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:83) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:84) - QQGVSYPRT
ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA SQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFG

	YYCARGAPMGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYSMN CDR2 (SEQ ID NO:88) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:89) - ARGAPMGAAAGWFDP	GGTKVEIK (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:90) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:91) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:92) - QQGVSFPRT
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREGAGFAYGMDYYYMD VWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:93) CDR1 (SEQ ID NO:95) - YTFTSYYMH CDR2 (SEQ ID NO:96) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:97) - AREGAGFAYGMDYYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQSDNWPFTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:98) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:99) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:100) - QQSDNWPFT

[0110] Альтернативно, вариабельный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO:101, может быть спарен с вариабельным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO:102, с образованием антигенсвязывающего участка, который может связываться с NKG2D, как показано в US 9273136.

SEQ ID NO:101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDY WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLP SGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0111] Альтернативно, вариабельный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO:103, может быть спарен с вариабельным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO:104, с образованием антигенсвязывающего участка, который может связываться с NKG2D, как показано в US 7879985.

SEQ ID NO:103

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS ANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVS S

SEQ ID NO:104

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0112] В таблице 2 приведены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с CLL-1/CLEC12A.

[0113] Таблица 2

Название антитела (источник)	Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи
Анти-CLEC12A антитело 4331 (US 2014/0120096 A1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARGNYGDE FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:115) CDR1: SGYTFTSY (SEQ ID NO:116) CDR2: IINPSGGS (SEQ ID NO:117) и CDR3: GNYGDEFDY (SEQ ID NO:118)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - RASQSISSYLN CDR2 (SEQ ID NO:121) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:122) - QQSYSTPPT

[0114] Антигенсвязывающие участки, которые могут связываться с опухолеасоциированным антигеном CLL1, могут быть идентифицированы путем скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO:123.

SEQ ID NO:123

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIG LGVLASMFHVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNLSTTLQTIATK LCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINN KNALEFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINR

LYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA

[0115] В Fc-домене связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 главным образом 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 домене CH2 (смотри Sondermann et al., Nature, 406 (6793):267-273). На основе известных доменов мутации для усиления или уменьшения аффинности связывания с CD16 могут быть выбраны, например с использованием библиотек фагового отображения или библиотек отображения кДНК на поверхности дрожжей, или могут быть сконструированы на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

[0116] Сборка тяжелых цепей гетеродимерного антитела может быть осуществлена путем экспрессии двух различных последовательностей тяжелой цепи антитела в одной и той же клетке, что может приводить к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также сборке гетеродимеров. Стимулирование сборки преимущественно гетеродимеров может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен CH3 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, могут быть сделаны мутации в домене CH3 на основе человеческого IgG1, включающие различные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, которые позволяют этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Все положения аминокислотных замен, показанные ниже, пронумерованы в соответствии с индексом EU по Кэбату.

[0117] В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде заменяет исходную аминокислоту на большую аминокислоту, выбранную из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), а по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту(ы) на меньшую аминокислоту(ы), выбранную из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), так что замена на большую аминокислоту (выпуклость) подходит к поверхности замен на меньшие аминокислоты (полость). Например, один полипептид может включать замену T366W, а другой может включать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

[0118] Вариабельный домен тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению может, необязательно, быть соединен с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнирный, CH2 и CH3 домены с доменом CH1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или

константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. В константную область могут быть введены одна или несколько мутаций по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например в 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. 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.

[0119] В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области человеческого IgG1, могут находиться в аминокислотах V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Ск константной области человеческого IgG1, могут находиться в аминокислотах E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

[0120] 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

[0121] 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

[0122] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора 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

[0123] 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

[0124] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в таблице 7, где положение(я), указанное в колонке первого полипептида, замещено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, а положение(я), указанное в колонке второго полипептида, замещено любой известной положительно заряженной аминокислотой.

Таблица 7	
Первый полипептид	Второй полипептид

K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

[0125] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в таблице 8, где положение(я), указанное в колонке первого полипептида, замещено любой известной положительно заряженной аминокислотой, а положение(я), указанное в колонке второго полипептида, замещено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 8	0
Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356 или E357	K409, K439, K370 или K392

[0126] 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

[0127] Альтернативно или дополнительно, структурная устойчивость гетеромультимерного белка может быть увеличена путем введения S354C или в первую, или во вторую полипептидную цепь, и Y349C в противоположную полипептидную цепь, что образует искусственный дисульфидный мостик на границе двух полипептидов.

[0128] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407.

[0129] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366.

[0130] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы,

состоящей из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

[0131] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

[0132] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, D399, S400 и Y407, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, N390, K392, K409 и T411.

[0133] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, N390, K392, K409 и T411, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, D399, S400 и Y407.

[0134] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, K360 и K409, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, E357, D399 и F405.

[0135] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, E357, D399 и F405, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, K360, Q347 и

K409.

[0136] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K370, K392, K409 и K439, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из D356, E357 и D399.

[0137] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из D356, E357 и D399, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K370, K392, K409 и K439.

[0138] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409.

[0139] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из Y349, L351, L368, K392 и K409, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399.

[0140] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

[0141] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной

последовательности константной области IgG1 заменой Y349C, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

[0142] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T.

[0143] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами Q347R, D399V и F405T, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

[0144] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

[0145] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

[0146] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

[0147] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

[0148] Мультиспецифические белки, описанные выше, могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую иммуноглобулиновую тяжелую цепь, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую иммуноглобулиновую тяжелую цепь, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуноглобулиновую легкую цепь, может быть клонирована в третий вектор экспрессии; и первый, второй и третий векторы экспрессии могут быть стабильно трансфицированы вместе в клетки-хозяева для получения мультимерных белков.

[0149] Для достижения наиболее высокого выхода мультиспецифического белка могут быть исследованы различные соотношения первого, второго и третьего векторов экспрессии для определения оптимального соотношения для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ограниченное разведение, ELISA, FACS, микроскопия или Clonepix.

[0150] Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для масштабов биореактора и поддержания экспрессии мультиспецифического белка. Мультиспецифические белки могут быть выделены и очищены с использованием способов, известных в данной области техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, клеточный лизис, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, обменную хроматографию гидрофобных взаимодействий и хроматографию со смешанным режимом.

II. Характеристики мультиспецифических белков

[0151] Мультиспецифические белки, описанные в настоящем изобретении, включают участок связывания NKG2D, участок связывания CD16 и опухолеасоциированный антиген CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки связываются одновременно с клетками, экспрессирующими NKG2D и/или CD16, такими как NK-клетки, и с опухолевыми клетками, экспрессирующими опухолеасоциированный антиген CLEC12A. Связывание мультиспецифических белков с NK-клетками может усиливать активность NK-клеток в отношении разрушения опухолевых клеток.

[0152] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки связываются с опухолеасоциированным антигеном CLEC12A с аффинностью, близкой к аффинности соответствующего моноклонального антитела (например, моноклонального антитела 4331, описанного в публикации патентной заявки США № 2104/0120096 A1). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки более эффективны при уничтожении опухолевых клеток, экспрессирующих опухолеасоциированный антиген CLEC12A, по сравнению с соответствующим моноклональным антителом.

[0153] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки,

описанные в настоящем изобретении, которые включают участок связывания NKG2D и участок связывания опухолеасоциированного антигена CLEC12A, активируют первичные человеческие NK-клетки при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими CLEC12A. Активация NK-клеток заметна по увеличению дегрануляции CD107a и продукции цитокина IFN-γ. Кроме того, по сравнению с соответствующим моноклональным антителом к CLEC12A мультиспецифические белки могут демонстрировать превосходную активацию человеческих NK-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих CLEC12A.

[0154] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические белки, описанные в настоящем изобретении, которые включают участок связывания NKG2D и участок связывания CLEC12A, увеличивают активность покоящихся и активированных IL-2 человеческих NK-клеток при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими CLEC12A.

[0155] В некоторых вариантах осуществления по сравнению с соответствующим моноклональным антителом, которое связывается с CLEC12A, мультиспецифические белки имеют преимущество в нацеливании на опухолевые клетки, которые экспрессируют CLEC12A. Мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем изобретении, могут быть более эффективными в снижении роста опухоли и уничтожении раковых клеток. Например, TriNKET A49-TriNKET-CLEC12A (связывающий NKG2D домен от клона ADI-27749 и CLEC12A-связывающий домен) обладает повышенной эффективностью и максимальным лизисом CLEC12A-экспрессирующих клеток-мишеней по сравнению с моноклональным анти-CLEC12A антителом.

III. Терапевтические применения

[0156] Настоящее изобретение относится к способам лечения рака с использованием мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем изобретении, и/или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении. Способы могут быть использованы для лечения различных видов рака, которые экспрессируют CLEC12A, путем введения нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем изобретении.

[0157] Терапевтический способ может быть охарактеризован в соответствии с подлежащим лечению раком. Например, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, тимому, аденокистозную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак молочной железы, глиобластому, рак легкого, рак яичников, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы или меланому.

[0158] В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак эндометрия, рак

пищевода, лейкоз, рак печени, рак прямой кишки, рак желудка, рак яичка или рак матки. В других вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, глиому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, билиарный рак, рак костей, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхиальной железы, карциноид, холангиокарциному, хондосаркому, папиллому/карциному хориоидного сплетения, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермальных синусов, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, рак эндотелиальных клеток, эпендимальный рак, рак эпителиальных клеток, саркому Юинга, рак глаз и орбит, рак женских половых органов, фокальную узловую гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангибластомы, гемангиоэндотелиому, гемангиомы, печеночную аденому, печеночный аденоматоз, гепатобилиарный рак, гепатоклеточную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интерэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, внутрипеченочный рак желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак сустава, саркому Капоши, рак таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, меланомы типа злокачественного лентиго, лимфому, рак половых органов у мужчин, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак рта, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак ротовой полости, остеосаркому, папиллярную серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, 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 поперечно-полосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную

карциному, рак мочеточника, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочевыделительной системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, рак вульвы, хорошо дифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

[0159] В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, экстанодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, узловая В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, В-клеточная лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны, лимфома Беркитта, лимфоплазмоцитарная лимфома, волосатоклеточный лейкоз или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления 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 Т-клеточная лимфома из естественных киллеров, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома типа подкожного панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома или периферическая Т-клеточная лимфома.

[0160] Подлежащий лечению рак может быть охарактеризован в соответствии с присутствием определенного антигена, экспрессируемого на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может помимо CLEC12A экспрессировать одно или несколько из следующего: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

[0161] В вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению рак выбирают из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелопролиферативных новообразований (MPN), лимфомы, неходжкинских лимфом и классической ходжкинской лимфомы.

[0162] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению рак представляет собой AML, выбранный из недифференцированного острого миелобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза с минимальным созреванием, острого миелобластного лейкоза с созреванием, острого промиелоцитарного лейкоза (APL), острого миеломоноцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией, острого моноцитарного лейкоза, острого эритроидного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза (AMKL), острого базофильного лейкоза, острого панмиелоза с фиброзом и бластного плазмацитоидного

дендритного клеточного новообразования (BPDCN). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения AML отличается экспрессией CLL-1 на лейкозных стволовых клетках (LSC) AML. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LSC у субъекта с AML дополнительно экспрессируют мембранный маркер, выбранный из CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32 и CD96. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения AML характеризуется как остаточная минимальная болезнь (MRD). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения MRD AML отличается наличием или отсутствием мутации, выбранной из FLT3-ITD (внутренние тандемные дупликации (ITD) Fms-подобной тирозинкиназы-3), NPM1 (нуклеофосмин-1), DNMT3A (ген ДНК-метилтрансферазы DNMT3A) и IDH (изоцитратдегидрогеназа-1 и 2 (IDH1 и IDH2)).

[0163] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой MDS, выбранный из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевидными сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицируемого MDS (MDS-U).

[0164] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению ALL выбирают из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащий лечению MPN выбирают из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащую лечению неходжкинскую лимфому выбирают из В-клеточной лимфомы и Т-клеточной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подлежащую лечению лимфому выбирают из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), зрелых T/NK-новообразований и гистиоцитарных новообразований.

IV. Комбинированная терапия

[0165] Другой аспект настоящего изобретения относится к комбинированной терапии. Мультиспецифический связывающий белок, описанный в настоящем изобретении, можно использовать в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами для лечения рака.

[0166] К типичным терапевтическим средствам, которые можно использовать как часть комбинированной терапии в лечении рака, относятся, например, облучение, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубицин, карбоквон, пентостатин, нитракрин, циностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин,

тимальфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбин, веснаринон, аминоглютетимид, 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, импросульфан, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпитиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма (IFN-γ), колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин-дифитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых средств, которые могут проявлять дифференциальное связывание со своим когнатным рецептором и увеличение или уменьшение периода полувыведения из сыворотки.

[0167] Дополнительным классом средств, которые можно использовать как часть комбинированной терапии в лечении рака, являются ингибиторы иммунных контрольных точек. К примерам ингибиторов иммунных контрольных точек относятся средства, которые ингибируют один или более из (i) цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена-4 (CTLA4), (ii) белка-1 запрограммированной смерти клетки (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 и (vii) TIM3. Ингибитор CTLA4 ипилимумаб был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для лечения меланомы.

[0168] Другими средствами, которые могут быть использованы как часть комбинированной терапии в лечении рака, являются средства-моноклональные антитела, которые нацелены на не являющиеся контрольными точками мишени (например, герцептин), и нецитотоксические средства (например, ингибиторы тирозинкиназы).

[0169] Другие категории противораковых средств 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 циклин-зависимой киназы, ингибитора ДНК-PK, ингибитора как ДНК-PK, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 с 2-хлордеоксиаденозином, ингибитора HDAC, ингибитора сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора как PARP1, так и DHODH, ингибитора протеасом, 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.

[0170] Белки настоящего изобретения можно также использовать в качестве вспомогательного средства при хирургическом удалении первичного очага.

[0171] Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического средства и относительное время введения могут быть выбраны для

достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при введении комбинированной терапии нуждающемуся в таком введении пациенту терапевтические средства в комбинации или фармацевтическую композицию или композиции, содержащие терапевтические средства, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, параллельно, вместе, одновременно и т.п. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить в то время, когда дополнительное терапевтическое средство(а) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

V. Фармацевтические композиции

[0172] Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в настоящем изобретении. Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Также для правильного составления в композицию могут быть включены один или более физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. Подходящие композиции для использования в настоящем раскрытии находятся в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарств смотри, например, в Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0173] Фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество мультиспецифического связывающего белка, содержащего участок связывания CLEC12A.

[0174] Внутривенная композиция для доставки лекарственных средств настоящего раскрытия может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой лиофилизированную композицию или жидкую композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть высушена вымораживанием (лиофилизирована) и может содержаться в приблизительно 12-60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть высушена вымораживанием, и 45 мг высушенной вымораживанием композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 40 мг до приблизительно 100 мг высушенной вымораживанием композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления высушенную вымораживанием композицию из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка во внутривенной лекарственной композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую композицию и может храниться в количестве от приблизительно 250 мг на флакон до приблизительно 1000 мг на флакон. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую композицию и может храниться в количестве приблизительно 600 мг на флакон. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую

композицию и может храниться в количестве приблизительно 250 мг на флакон.

[0175] Белок может существовать в жидкой водной фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество белка в буферном растворе, образующем композицию.

[0176] Эти композиции могут быть стерилизованы методами обычной стерилизации, или могут быть стерильно отфильтрованы. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным носителем перед введением. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8, и, наиболее предпочтительно, от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в несколько стандартных лекарственных форм, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого средства или средств. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для получения гибкого количества.

[0177] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к композиции с длительным сроком хранения, включающейбелок согласно настоящему раскрытию в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом фосфата динатрия, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

[0178] В некоторых вариантах осуществления получают водную композицию, включающую белок согласно настоящему раскрытию в pH-буферном растворе. Буфер согласно настоящему изобретению может иметь pH в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 8, например от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0 или от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,5, или может иметь pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2. Предполагается, что диапазоны, промежуточные по отношению к указанным выше значениям pH, также являются частью настоящего раскрытия. Например, предполагается, что включены диапазоны значений, использующие комбинацию любого из приведенных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего предела. Примеры буферов, которые будут контролировать pH в пределах этого диапазона, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот.

[0179] В некоторых вариантах осуществления композиция включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH может составлять от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0, или от приблизительно pH 4,8 до приблизительно 5,5, или в диапазоне pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат фосфата динатрия и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает приблизительно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл),

приблизительно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), приблизительно 1,5 мг/мл дигидрата фосфата динатрия (например, 1,53 мг/мл), приблизительно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86) и приблизительно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, 0,25-0,5 мг/мл цитрата натрия, 1,25-1,75 мг/мл дигидрата фосфата динатрия, 0,7-1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и 6,0-6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления pH композиции корректируют с помощью гидроксида натрия.

[0180] Полиол, который действует как модификатор тоничности и может стабилизировать антитело, может быть также включен в композицию. Полиол добавляют к композиции в количестве, которое можно варьировать в зависимости от желаемой изотоничности композиции. В некоторых вариантах осуществления водная композиция может быть изотонической. Количество добавляемого полиола также может быть изменено в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (например, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиолом, который можно использовать в композиции в качестве средства, регулирующего тоничность, является маннит. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 7,5 до 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять приблизительно 10-14 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять приблизительно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в композицию может быть включен полиол сорбит.

[0181] Также в композицию может быть добавлен детергент или поверхностно-активное вещество. К примерам детергентов относятся неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что он уменьшает агрегацию составляемого антитела, и/или минимизирует образование частиц в композиции, и/или уменьшает адсорбцию. В некоторых вариантах осуществления композиция может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать детергент полисорбат 80 или Tween 80. Tween 80 является термином, используемым для описания полиоксиэтилена (20) сорбитанмоноолеата (смотри Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать между приблизительно 0,1 мг/мл и приблизительно 10 мг/мл полисорбата 80 или между приблизительно 0,5 мг/мл и приблизительно 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в композицию может быть добавлено приблизительно 0,1% полисорбата 80.

[0182] В вариантах осуществления белковый продукт настоящего раскрытия

составляют в виде жидкой композиции. Жидкая композиция может быть представлена в концентрации 10 мг/мл или в любом флаконе 50R типа I Ф.США/ЕФ, закрытом резиновой пробкой и запечатанном алюминиевой обжимной крышкой. Пробка может быть сделана из эластомера, соответствующего Ф.США и ЕФ. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, для того чтобы обеспечивать извлекаемый объем 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция может быть разбавлена 0,9% солевым раствором.

[0183] В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция раскрытия может быть получена в виде раствора концентрации 10 мг/мл в комбинации с стабилизирующим количеством сахара. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция может быть получена в водном носителе. В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен стабилизатор в количестве, не превышающем того, которое может привести к вязкости, нежелательной или неподходящей для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления сахар может представлять собой дисахариды, например сахарозу. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция может также включать одно или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества и консерванта.

[0184] В некоторых вариантах осуществления pH жидкой композиции может быть задан путем добавления фармацевтически приемлемых кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой соляную кислоту. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

[0185] Помимо агрегации, распространенным вариантом продукта у пептидов и белков является дезамидирование, которое может происходить во время ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного продукта и во время анализа образцов. Дезамидирование представляет собой потерю NH_3 у белка с образованием сукцинимидного промежуточного соединения, которое может подвергаться гидролизу. Сукцинимидное промежуточное соединение приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение сукцинимидного промежуточного соединения затруднено из-за нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование обычно определяется как увеличение массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит к аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоте. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, соседствующие с Asn в пептидной цепи, влияют на скорости дезамидирования. Gly и Ser после Asn в белковых последовательностях приводят к более высокой восприимчивости к дезамидированию.

[0186] В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция настоящего

раскрытия может быть храниться в условиях pH и влажности, предотвращающих дезаминирование белкового продукта.

[0187] Представляющим интерес водным носителем в настоящем изобретении является тот, который фармацевтически приемлем (безопасен и нетоксичен для введения человеку) и полезен для получения жидкой композиции. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0188] Консервант может быть, необязательно, добавлен к композициям настоящего документа для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразовой (многодозовой) композиции.

[0189] Внутривенные (в/в) композиции могут быть предпочтительным способом введения в особых случаях, например когда пациент находится в больнице после трансплантации и получает все лекарственные средства в/в путем. В некоторых вариантах осуществления жидкую композицию разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия перед введением. В некоторых вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и подходящим для введения путем внутривенной инфузии.

[0190] В некоторых вариантах осуществления солевые или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с "образующими основание" металлами или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой глицинатный, карбонатный, цитратный буферы, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[0191] Консервант может быть, необязательно, добавлен к композициям настоящего документа для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразовой (многодозовой) композиции.

[0192] Представляющим интерес водным носителем в настоящем изобретении является тот, который фармацевтически приемлем (безопасен и нетоксичен для введения человеку) и полезен для получения жидкой композиции. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0193] Белок согласно настоящему раскрытию может существовать в виде лиофилизированной композиции, включающей белки и лиопротектор. Лиопротектор может представлять собой сахар, например дисахариды. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированная композиция может также включать одно или несколько из буферного

средства, поверхностно-активного вещества, объемообразующего средства и/или консерванта.

[0194] Количество сахарозы или мальтозы, полезное для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может составлять весовое отношение белка к сахарозе или мальтозе по меньшей мере 1:2. В некоторых вариантах осуществления весовое отношение белка к сахарозе или мальтозе может составлять от 1:2 до 1:5.

[0195] В некоторых вариантах осуществления pH композиции до лиофилизации может быть выставлен путем добавления фармацевтически приемлемых кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может быть соляная кислота. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может быть гидроксид натрия.

[0196] До лиофилизации pH раствора, содержащего белок согласно настоящему раскрытию, может быть выставлен от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

[0197] В некоторых вариантах осуществления солевые или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с "образующими основание" металлами или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой глицинатный, карбонатный, цитратный буферы, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[0198] В некоторых вариантах осуществления может быть добавлено "объемообразующее средство". "Объемообразующее средство" представляет собой соединение, которое добавляет массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (например, облегчает получение по существу однородного лиофилизированной массы, который сохраняет структуру с открытыми порами). Иллюстративные объемообразующие средства включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные композиции согласно настоящему изобретению могут содержать такие объемообразующие средства.

[0199] Консервант может быть, необязательно, добавлен к композициям настоящего документа для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразовой (многодозовой) композиции.

[0200] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть восстановлен с помощью водного носителя. Представляющим интерес водным носителем в настоящем изобретении является тот, который фармацевтически приемлем (например, безопасен и нетоксичен для введения человеку) и полезен для получения жидкой композиции после лиофилизации. Иллюстративные

разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0201] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт настоящего раскрытия восстанавливают или с помощью стерильной воды для инъекций, Ф.США (SWFI), или с помощью 0,9% хлорида натрия для инъекций, Ф.США. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

[0202] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт настоящего раскрытия восстанавливают водой для инъекций до приблизительно 4,5 мл и разводят 0,9% солевым раствором (раствором хлорида натрия).

[0203] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях настоящего изобретения можно варьировать так, чтобы получать количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

[0204] Конкретная доза может быть одинаковой дозой для каждого пациента, например 50-5000 мг белка. Альтернативно, доза пациента может быть адаптирована к приблизительной массе или площади поверхности тела пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать подлежащее лечению или предупреждению заболевание или состояние, тяжесть заболевания, способ введения и возраст, пол и состояние здоровья пациента. Специалисты в данной области техники обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозировки для лечения, в частности исходя из информации о дозировке и из анализов, раскрытых в настоящем изобретении. Дозировка также может быть определена путем использования известных анализов для определения дозировки, используемых вместе с соответствующими данными доза-ответ. Дозировка для отдельного пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием заболевания. Могут быть измерены уровни нацеливаемой конструкции или комплекса в крови у пациента, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Для определения того, какие нацеливаемые конструкции и/или комплексы и их дозы наиболее вероятно будут эффективны для данного индивидуума, можно использовать фармакогеномику (Schmitz et al., Clinica Chimica Acta 308: 43-53, 2001; Steimer et al., Clinica Chimica Acta 308: 33-41, 2001).

[0205] Обычно дозировки в зависимости от массы тела составляют от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, например от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 50 мкг на кг массы тела, от

приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 0,1 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг на кг массы тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мкг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мкг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 50 мкг на кг массы тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг на кг массы тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мкг на кг массы тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 50μg до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мкг на кг массы тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 1 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг на кг массы тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 50 мг на кг массы тела, от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг на кг массы тела.

[0206] Дозы могут вводиться один или более раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно, или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторения дозирования на основании измеренных времен пребывания и концентраций нацеливаемой конструкции или комплекса в телесных жидкостях или тканях. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, внутриполостным, путем перфузии через катетер или путем прямой внутриочаговой инъекции. Введение может осуществляться один или более раз в день, один или более раз в неделю, один или более раз в месяц и один или

более раз в год.

[0207] Приведенное выше описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения. В этой заявке на патент конкретно рассматриваются все комбинации и перестановки аспектов и вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

[0208] Настоящее изобретение, описанное в общих чертах, будет более понятным благодаря ссылке на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, и которые не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Пример 1 - Связывающие NKG2D домены связываются с NKG2D

Связывающие NKG2D домены связываются с очищенным рекомбинантный NKG2D

[0209] Последовательности нуклеиновой кислоты эктодоменов NKG2D человека, мыши или яванского макака сливали с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими Fc-домены IgG1 человека, и вводили клетки млекопитающих для экспрессии. После очистки белки слияния NKG2D-Fc адсорбировали в лунках микропланшетов. После блокирования лунок бычьим сывороточным альбумином для предотвращения неспецифического связывания связывающие NKG2D домены титровали и добавляли в лунки с предварительным адсорбированием белков слияния NKG2D-Fc. Связывание первичного антитела детектировали с использованием вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена и специфически распознающего человеческую легкую цепь каппа, для предупреждения перекрестной реактивности Fc. 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (TMB), субстрат пероксидазы хрена, добавляли в лунки для визуализации сигнала связывания, поглощение которого измеряли на 450 нм и корректировали на 540 нм. В каждую лунку добавляли клон связывающего NKG2D домена, изотипический контроль или положительный контроль (содержащий вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышиного NKG2D, доступные от eBioscience).

[0210] Изотипический контроль показал минимальное связывание с рекомбинантными белками NKG2D-Fc, тогда как положительный контроль связывался с рекомбинантными антигенами наиболее сильно. Связывающие NKG2D домены, продуцируемые всеми клонами, демонстрировали связывание с рекомбинантными белками NKG2D-Fc человека, мыши и яванского макака, хотя и с разной аффинностью от клона к клону. В основном, каждый анти-NKG2D клон связывался с рекомбинантными NKG2D-Fc человека (фиг. 3) и яванского макака (фиг. 4) с близкой аффинностью, но с более низкой аффинностью с мышиным (фиг. 5) рекомбинантным NKG2D-Fc.

Связывающие NKG2D домены связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D

[0211] Линии клеток мышиной лимфомы EL4 были сконструированы для экспрессии химерных антигенных рецепторов человеческий или мышиный NKG2D-

сигнальный домен CD3-дзета. Связывающий NKG2D клон, изотипический контроль или положительный контроль использовали в концентрации 100 нМ для окрашивания внеклеточного NKG2D, экспрессируемого на клетках EL4. Связывание антител детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител против человеческого IgG. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, и рассчитывали повышение относительно фона (FOB) с использованием средней интенсивности флуоресценции (MFI) NKG2D-экспрессирующих клеток по сравнению с родительскими клетками EL4.

[0212] Связывающие NKG2D домены, продуцируемые всеми клонами, связывались с клетками EL4, экспрессирующими человеческий и мышиный NKG2D. Антитела положительного контроля (содержащие вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышиного NKG2D, доступные от eBioscience) давали сигнал связывания с наилучшим FOB. Аффинность связывания с NKG2D для каждого клона была сходной между клетками, экспрессирующими человеческий NKG2D (фиг. 6) и мышиный (фиг. 7) NKG2D.

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

Конкуренция с ULBP-6

[0213] Рекомбинантные белки NKG2D-Fc человека адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для уменьшения неспецифического связывания. В лунки добавляли насыщающую концентрацию ULBP-6-His-биотина с последующим добавлением клонов связывающих NKG2D доменов. После 2-часовой инкубации лунки промывали, и ULBP-6-His-биотин, который оставался связан с лунками, покрытыми NKG2D-Fc, детектировали с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и субстрата TMB. Поглощение измеряли на 450 нм и корректировали на 540 нм. После вычитания фона рассчитывали специфическое связывание связывающих NKG2D доменов с белками NKG2D-Fc по процентной доле ULBP-6-His-биотина, связывание которого с белками NKG2D-Fc в лунках было заблокировано. Антитело положительного контроля (содержащее вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104) и различные связывающие NKG2D домены блокировали связывание ULBP-6 с NKG2D, тогда как изотипический контроль показал небольшую конкуренцию с ULBP-6 (фиг. 8).

Последовательность ULBP-6 представлена SEQ ID NO:108

MAAAAIPALLLCLPLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQ
VDEKTFLHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEK
WENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTL
ILCCLLIILPCFILPGI (SEQ ID NO:108)

Конкуренция с MICA

[0214] Рекомбинантные белки MICA-Fc человека адсорбировали в лунках

микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для уменьшения неспецифического связывания. В лунки добавляли NKG2D-Fc-биотин, а затем связывающие NKG2D домены. После инкубации и промывания NKG2D-Fc-биотин, который оставался связан с лунками, покрытыми MICA-Fc, детектировали с использованием стрептавидина-HRP и субстрата TMB. Поглощение измеряли на 450 нм и корректировали на 540 нм. После вычитания фона рассчитывали специфическое связывание связывающих NKG2D доменов с белками NKG2D-Fc по процентной доле NKG2D-Fc-биотина, связывание которого с покрытыми MICA-Fc лунками было заблокировано. Антитело положительного контроля (содержащее вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104) и различные связывающие NKG2D домены блокировали связывание MICA с NKG2D, тогда как изотипический контроль показал небольшую конкуренцию с MICA (фиг. 9).

Конкуренция с Rae-1-дельта

[0215] Рекомбинантный мышиный Rae-1-дельта-Fc (приобретенный у R&D Systems) адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для уменьшения неспецифического связывания. В лунки добавляли мышиный NKG2D-Fc-биотин, а затем связывающие NKG2D домены. После инкубации и промывания NKG2D-Fc-биотин, который оставался связан с лунками, покрытыми Rae-1-дельта-Fc, детектировали с использованием стрептавидина-HRP и субстрата TMB. Поглощение измеряли на 450 нм и корректировали на 540 нм. После вычитания фона рассчитывали специфическое связывание связывающих NKG2D доменов с белками NKG2D-Fc по процентной доле NKG2D-Fc-биотина, связывание которого с покрытыми Rae-1-дельта-Fc лунками было заблокировано. Положительный контроль (содержащий вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO:101-104, или клоны MI-6 и CX-5 против мышиного NKG2D, доступные от eBioscience) и различные клоны связывающих NKG2D доменов блокировали связывание Rae-1-дельта с мышиным NKG2D, тогда как антитело изотипического контроля показало небольшую конкуренцию с Rae-1-дельта (фиг. 10).

Пример 3 - Клоны связывающих NKG2D доменов активируют NKG2D

[0216] Последовательности нуклеиновой кислоты человеческого и мышиного NKG2D сливали с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими сигнальный домен CD3-дзета, для получения конструкций с химерным антигенным рецептором (CAR). Затем конструкции NKG2D-CAR клонировали в ретровирусный вектор с использованием Gibson Assembly и трансфицировали в клетки expi293 для продуцирования ретровируса. Клетки EL4 инфицировали вирусами, содержащими NKG2D-CAR, вместе с 8 мкг/мл полибрена. Через 24 часа после инфицирования анализировали уровни экспрессии NKG2D-CAR в клетках EL4 с помощью проточной цитометрии, и выбирали клоны, которые экспрессируют NKG2D-CAR на клеточной поверхности на высоком уровне.

[0217] Чтобы определить, активируют ли NKG2D связывающие NKG2D домены,

их адсорбировали в лунках микропланшета, и клетки EL4 с NKG2D-CAR культивировали в покрытых фрагментом антитела лунках в течение 4 часов в присутствии брефелдина-А и монензина. Внутриклеточную продукцию TNF-α, показатель активации NKG2D, анализировали с помощью проточной цитометрии. Процентную долю TNF-α-положительных клеток нормализовали по клеткам, обработанным положительным контролем. Все связывающие NKG2D домены активировали как человеческий NKG2D (фиг. 11), так и мышиный NKG2D (фиг. 12).

Пример 4 - Связывающие NKG2D домены активируют NK-клетки

Первичные человеческие NK-клетки

[0218] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитарной пленки периферической крови человека с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки ($CD3^-CD56^+$) выделяли из PBMC с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных гранул, и чистота выделенных NK-клеток обычно составляла >95%. Затем выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, в течение 24-48 часов, после чего их переносили в лунки микропланшета, в которых были адсорбированы связывающие NKG2D домены, и культивировали в среде, содержащей конъюгированное с флуорофором анти-CD107a антитело, брефелдин-А и монензин. После культивирования NK-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием конъюгированных с флуорофором антител против CD3, CD56 и IFN-γ. Для оценки активации NK-клеток анализировали окрашивание CD107a и IFN-γ в $CD3^-$ $CD56^+$ клетках. Увеличение количества CD107a/IFN-γ двойных положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет участия двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора. Связывающие NKG2D 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) показали более высокую процентную долю NK-клеток, становящихся $CD107a^+$ и IFN-γ^+, чем изотипический контроль (фиг. 13 и фиг. 14 представляют данные двух независимых экспериментов, в которых для получения NK-клеток использованы PBMC разных доноров).

Первичные мышиные NK-клетки

[0219] Селезенки мышей C57Bl/6 получали и пропускали через клеточное сито 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Клетки осаждали и ресуспендировали в буфере ACK для лизиса (приобретен у Thermo Fisher Scientific #A1049201; 155 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната калия, 0,01 мМ ЭДТА) для удаления эритроцитов. Оставшиеся клетки культивировали с 100 нг/мл hIL-2 в течение 72 часов, а затем собирали и подготавливали для выделения NK-клеток. Затем NK-клетки ($CD3^-NK1.1^+$) выделяли из клеток селезенки с использованием метода отрицательного истощения с помощью магнитных гранул, как правило, с чистотой >90%. Очищенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл mIL-15 в течение 48 часов, после чего их переносили в

лунки микропланшета, в которых были адсорбированы связывающие NKG2D домены, и культивировали в среде, содержащей конъюгированное с флуорофором анти-CD107a антитело, брефелдин-А и монензин. После культивирования в покрытых связывающими NKG2D доменами лунках NK-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием конъюгированных с флуорофором антител против CD3, NK1.1 и IFN-γ. Для оценки активации NK-клеток анализировали окрашивание CD107a и IFN-γ в $CD3^-$ $NK1.1^+$ клетках. Увеличение количества CD107a/IFN-γ двойных положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет участия двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора. Связывающие NKG2D домены и положительный контроль (выбранный из клонов MI-6 и CX-5 против мышиного NKG2D, доступных от eBioscience) показали более высокую процентную долю NK-клеток, становящихся $CD107a^+$ и IFN-γ^+, чем изотипический контроль (фиг. 15 и фиг. 16 представляют данные двух независимых экспериментов, в которых для получения NK-клеток использованы разные мыши).

Пример 5 - Связывающие NKG2D домены обеспечивают цитотоксичность опухолевых клеток-мишеней

[0220] Анализы активации человеческих и мышиных первичных NK-клеток продемонстрировали увеличение маркеров цитотоксичности на NK-клетках после инкубации с связывающими NKG2D доменами. Чтобы определить, приводит ли это к усилению лизиса опухолевых клеток, использовали клеточный анализ, в котором каждый связывающий NKG2D домен превращали в моноспецифическое антитело. Область Fc использовали в качестве одного нацеливающего плеча, тогда как области фрагментов Fab (связывающий NKG2D домен) выполняли роль другого нацеливающего плеча для активации NK-клеток. Клетки THP-1, которые имеют человеческое происхождение и экспрессируют высокие уровни рецепторов Fc, использовали в качестве опухоли-мишени, и использовали Perkin Elmer DELFIA Cytotoxicity Kit. Клетки THP-1 метили реагентом BATDA и ресуспендировали по 10^5 на мл в культуральной среде. Меченые клетки THP-1 затем объединяли с антителами NKG2D и выделенными мышиными NK-клетками в лунках микротитровального планшета при 37°C в течение 3 часов. После инкубации 20 мкл культурального супернатанта удаляли, смешивали с 200 мкл раствора европия и инкубировали при встряхивании в течение 15 минут в темноте. Измеряли флуоресценцию с течением времени с помощью планшет-ридера PheraStar, оснащенного модулем флуоресценции с разрешением по времени (возбуждение 337 нМ, излучение 620 нМ), и рассчитывали специфический лизис в соответствии с инструкциями к набору.

[0221] Положительный контроль, ULBP-6 - природный лиганд для NKG2D - конъюгированный с Fc, показал повышенный специфический лизис клеток-мишеней THP-1 мышиными NK-клетками. Антитела к NKG2D также усиливали специфический лизис клеток-мишеней THP-1, тогда как антитело изотипического контроля показало снижение специфического лизиса. Пунктирная линия обозначает специфический лизис клеток THP-1 мышиными NK-клетками без добавления антител (фиг. 17).

Пример 6 - Антитела к NKG2D показывают высокую термостабильность

[0222] Температуры плавления связывающих NKG2D доменов анализировали с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии. Экстраполированные кажущиеся температуры плавления высоки по сравнению с типичными для антител IgG1 (фиг. 18).

Пример 7 - Синергетическая активация человеческих NK-клеток путем перекрестного связывания NKG2D и CD16

Анализ активации первичных человеческих NK-клеток

[0223] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитарной пленки человеческой периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки очищали от PBMC с использованием отрицательных магнитных гранул (StemCell #17955). По результатам проточной цитометрии >90% NK-клеток были $CD3^-CD56^+$. Затем клетки размножали 48 часов в среде, содержащей 100 нг/мл hIL-2 (Peprotech #200-02), и потом использовали в анализе активации. Антителами покрывали 96-луночный планшет с плоским дном в концентрации 2 мкг/мл (анти-CD16, Biolegend #302013) и 5 мкг/мл (анти-NKG2D, R&D #MAB139) в 100 мкл стерильного ФСБ в течение ночи при 4°C с последующим тщательным промыванием лунок для удаления избытка антител. Для оценки дегрануляции активированные IL-2 NK-клетки ресуспендировали по 5×10^5 клеток на мл в культуральной среде, дополненной 100 нг/мл человеческого IL-2 (hIL2) и 1 мкг/мл APC-конъюгированного анти-CD107a mAb (Biolegend #328619). Затем на планшеты, покрытые антителами, добавляли по 1×10^5 клеток на лунку. Добавляли ингибиторы транспорта белка брефелдин A (BFA, Biolegend #420601) и монензин (Biolegend #420701) в конечном разведении 1:1000 и 1:270, соответственно. Клетки на планшетах инкубировали в течение 4 часов при 37°C в 5% CO_2. Для внутриклеточного окрашивания IFN-γ NK-клетки метили анти-CD3 (Biolegend #300452) и анти-CD56 mAb (Biolegend #318328), а затем фиксировали, пермеабилизировали и метили анти-IFN-γ mAb (Biolegend #506507). NK-клетки анализировали в отношении экспрессии CD107a и IFN-γ с помощью проточной цитометрии после гейтирования на живые $CD56^+CD3^-$ клетки.

[0224] Для исследования относительной активности комбинации рецепторов проводили анализ перекрестного связывания NKG2D или CD16 и совместного перекрестного связывания обоих рецепторов путем стимуляции при связывании на планшете. Как показано на фигуре 19 (фиг. 19A-19C), комбинированная стимуляция CD16 и NKG2D приводила к сильно повышенным уровням CD107a (дегрануляция) (фиг. 19A) и/или продукции IFN-γ (фиг. 19B). Пунктирные линии представляют аддитивный эффект отдельных стимуляций каждого рецептора.

[0225] Уровни CD107a уровни и продукцию внутриклеточного IFN-γ у активированных IL-2 NK-клеток анализировали после 4 часов стимуляции при связывании на планшете анти-CD16, анти-NKG2D или комбинацией обоих моноклональных антител. Диаграммы показывают среднее (n=2)±CO. Фиг. 19A

демонстрирует уровни CD107a; фиг. 19B демонстрирует уровни IFN-γ; фиг. 19C демонстрирует уровни CD107a и IFN-γ. Данные, показанные на фиг. 19A-19C, представляют пять независимых экспериментов с использованием пяти разных здоровых доноров.

[0226] Пример 8 - Опосредованная триспецифическим связывающим белком (TriNKET) усиленная цитотоксичность для клеток-мишеней

Оценка связывания TriNKET с клетками, экспрессируемыми человеческий NKG2D:

[0227] Клетки EL4, трансдуцированные человеческим NKG2D, использовали для тестирования связывания A49-TriNKET-CLEC12A (связывающий NKG2D домен от клона ADI-27749 и связывающий CLEC12A домен от моноклонального антитела 4331, описанного в US2014/0120096 (смотри на стр. 21)) с клетками, экспрессирующими человеческий NKG2D. TriNKET разводили до максимальной концентрации, а затем разводили серийно. Разведения mAb или TriNKET использовали для окрашивания клеток, и детектировали связывание TriNKET или mAb с использованием конъюгированного флуорофором античеловеческого вторичного антитела IgG. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, MFI при связывании нормализовали по контрольным вторичным антителам для получения значений повышения относительно фона.

[0228] Фиг. 35 и Фиг. 36 показывают связывание нацеленных на CLEC12A TriNKET с линиями клеток человеческого AML, экспрессирующими CLEC12A. Моноклональное анти-CLEC12A антитело и TriNKET показали сходное связывание как с клетками SKM-1 (фиг. 35), так и с клетками U937 (фиг. 36).

Оценка связывания TriNKET или mAb с экспрессируемыми клетками антигенами рака человека:

[0229] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие CLEC12A, использовали для оценки связывания опухолевого антигена нацеленными на CLEC12A TriNKET. Линии U937 и SKM-1 клеток человеческого AML использовали для оценки связывания TriNKET с экспрессируемым клетками CLEC12A. TriNKET или mAb разводили и инкубировали с соответствующими клетками. Связывание TriNKET детектировали с использованием конъюгированного с флуорофором античеловеческого вторичного антитела IgG. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, MFI при связывании с экспрессируемым клетками CLEC12A нормализовали по контрольным вторичным антителам для получения значений повышения относительно фона.

[0230] Фиг. 37 показывает связывание CLEC12A-TriNKET с человеческим NKG2D, экспрессируемым на поверхности клеток EL4. Связывание с NKG2D, экспрессируемым на поверхности клеток, было слабым, но детектируемым по сравнению с моноклональным анти-CLEC12A антителом.

Оценка интернализации TriNKET или mAb:

[0231] Линии HL60, SKM-1 и U937 клеток человеческого AML использовали для оценки интернализации TrINKET, связанных с CLEC12A, экспрессируемым на клеточной

поверхности. TriNKET или mAb разводили до 20 мкг/мл, и использовали разведения для окрашивания клеток. После окрашивания поверхности образцы CLEC12A разделяли, две трети образца помещали при 37°C на ночь для облегчения интернализации, а у трети образца детектировали связанное антитело с использованием конъюгированного с флуорофором античеловеческого вторичного антитела IgG. Клетки фиксировали после окрашивания вторичным антителом и хранили при 4°C в течение ночи для анализа на следующий день. Через 2 и 20 часов при 37°C образцы извлекали из инкубатора, и детектировали связанное антитело на поверхности клеток с использованием конъюгированного с флуорофором античеловеческого вторичного антитела IgG. Образцы фиксировали и все образцы анализировали в тот же день. Интернализацию антител или TriNKET рассчитывали следующим образом: % интернализации = (1-(MFI образца через 24 ч/фоновая MFI)) * 100%.

[0232] Фиг. 38, 39, и 40 показывают интернализацию TriNKET, нацеленных на CLEC12A, после инкубации с клетками HL60 (фиг. 38), SKM-1 (фиг. 39) и U937 (фиг. 40), соответственно. Анти-CD33 антитело линтузумаб использовали в качестве положительного контроля для интернализации, поскольку клеточными линиями HL60 (фиг. 38), SKM-1 (фиг. 39) и U937 (фиг. 40) экспрессируется CD33. Линтузумаб показал высокие уровни интернализации на всех клеточных линиях, которые росли со временем. На всех трех протестированных клеточных линиях анти-CLEC12A mAb и TrINKET показали близкие уровни интернализации после 2-часовой и 20-часовой инкубации.

Анализ цитотоксичности первичных человеческих NK-клеток:

[0233] PBMC выделяли из лейкоцитарной пленки периферической крови человека с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и подготавливали для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли с использованием метода отрицательного отбора с помощью магнитных гранул, чистота выделенных NK-клеток обычно составляла >90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки оставляли на ночь. Покоящиеся NK-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

[0234] Фиг. 41 и 42 показывают уничтожение первичными человеческими NK-клетками CLEC12A-положительных клеточных линий человеческого AML. Покоящиеся человеческие NK-клетки проявляли небольшую активность в отношении клеток HL60 (фиг. 41) и Mv4-11 (фиг. 42) при соотношении эффектор-мишень 5:1. Нацеленный на CLEC12A TriNKET показал эффективное уничтожение дозозависимым образом как клеток HL60 (фиг. 41), так и клеток Mv4-11 (фиг. 42). Моноклональное антитело против CLEC12A показало только слабую активность в отношении HL60 (фиг. 41) и Mv4-11 (фиг. 42), тогда как ненацеленный TrINKET не проявил активности. CLEC12A-TriNNKET показали лучшую активность в отношении клеток HL60 (фиг. 41), которые экспрессируют более высокие уровни CLEC12A по сравнению с клетками Mv4-11 (фиг. 42).

Анализ цитотоксичности DELFIA

[0235] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую

интерес мишень, собирали из культуры, промывали HBS и ресуспендировали в среде для роста в количестве 10^6 клеток на мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer, AD0116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки промывали 3 раза HBS и ресуспендировали по $0,5\times10^5$ клеток на мл в культуральной среде. Для получения лунок фона убирали аликвоту меченых клеток, и извлекали клетки из среды. В лунки аккуратно добавляли по 100 мкл среды в трех повторностях, чтобы избежать повреждения осажденных клеток. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл меченных BATDA клеток. Лунки сохраняли для спонтанного высвобождения из клеток-мишеней и подготавливали для лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Triton-X. Моноклональные антитела или TriNKET против представляющей опухоли-мишени разводили в культуральной среде, и в каждую лунку добавляли по 50 мкл разведенного mAb или TriNKET. Покоящиеся NK-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали по $1,0\times10^5$-$2,0\times10^6$ клеток на мл в культуральной среде в зависимости от требуемого соотношения эффектор-клетка-мишень. В каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл NK-клеток для получения общего объема культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение 2-3 часов до проведения анализа.

[0236] После культивирования в течение 2-3 часов планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут. 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора европия (Perkin Elmer C135-100) комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на встряхивателе для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывали с использованием прибора Victor 3 или SpectraMax® i3X (Molecular Devices), и рассчитывали процент специфического лизиса (% специфического лизиса = (высвобождение в эксперименте - спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение)) × 100).

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0237] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящем изобретении, включено посредством ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0238] Изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или существенных характеристик. Следовательно, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящем изобретении. Таким образом, объем изобретения обозначен прилагаемой формулой изобретения, а не вышеприведенным описанием, и предполагается, что он охватывает все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывает CLL-1/CLEC12A; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16.

2. Белок по п.1, в котором первый антигенсвязывающий участок связывается с NKG2D у людей, не являющихся людьми приматов и грызунов.

3. Белок по п.1 или 2, в котором первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

4. Белок по п.3, в котором вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи присутствуют на одном и том же полипептиде.

5. Белок по п.п. 3 или 4, в котором второй антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

6. Белок по п.5, в котором вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка присутствуют на одном и том же полипептиде.

7. Белок по п.5 или 6, в котором вариабельный домен легкой цепи первого антигенсвязывающего участка имеет аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой цепи второго антигенсвязывающего участка.

8. Белок по любому из п.п. 1-7, в котором первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:41, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:42.

10. Белок по любому из п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:49, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:50.

11. Белок по любому из п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:57, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO:58.

12. Белок по любому из п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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 п.п. 1-8, в котором первый антигенсвязывающий участок 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, в котором первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.

21. Белок по п.20, в котором однодоменное антитело представляет собой фрагмент V_HH или фрагмент V_{NAR}.

22. Белок по любому из п.п. 1-2 или 20-21, в котором второй антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

23. Белок по п.22, в котором вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка присутствуют на одном и том же полипептиде.

24. Белок по любому из п.п. 1-4 или 8-19, в котором второй антигенсвязывающий

участок представляет собой однодоменное антитело.

25. Белок по п.24, в котором второй антигенсвязывающий участок представляет собой фрагмент V_HH или фрагмент V_{NAR}.

26. Белок по любому из п.п. 1-25, в котором второй антигенсвязывающий участок связывает CLEC12A, вариабельный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:115, и вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:119.

27. Белок по п.26, в котором вариабельный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, включающую:

последовательность CDR1 тяжелой цепи, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:117; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:118.

28. Белок по п.27, в котором вариабельный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего участка содержит аминокислотную последовательность, включающую:

последовательность CDR1 легкой цепи, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:120;

последовательность CDR2 легкой цепи, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:121;

и последовательность CDR3 легкой цепи, идентичную аминокислотной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:122.

29. Белок по любому из п.п. 1-28, содержащий часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, причем Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2 домены.

30. Белок по п.29, в котором Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2 домены человеческого антитела IgG1.

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

32. Белок по любому из п.п. 29-31, в котором Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену человеческого IgG1, и отличается в одном или нескольких положениях, 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. Состав, содержащий белок по любому из п.п. 1-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

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

35. Способ непосредственного и/или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток, включающий воздействие на опухоль и естественные клетки-киллеры белка по любому из п.п. 1-32.

36. Способ лечения рака, включающий введение пациенту белка по любому из п.п. 1-32 или композиции по п.33.

37. Способ по п.36, в котором рак выбирают из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелопролиферативных новообразований (MPN), лимфомы, неходжкинских лимфом и классической ходжкинской лимфомы.

38. Способ по п.37, в котором AML выбирают из недифференцированного острого миелобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза с минимальным созреванием, острого миелобластного лейкоза с созреванием, острого промиелоцитарного лейкоза (APL), острого миеломоноцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией, острого моноцитарного лейкоза, острого эритроидного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза (AMKL), острого базофильного лейкоза, острого панмиелоза с фиброзом и бластного плазмацитоидного дендритного клеточного новообразования (BPDCN).

39. Способ по п.37 или 38, в котором AML отличается экспрессией CLL-1 на лейкозных стволовых клетках (LSC) AML.

40. Способ по п.39, в котором LSC дополнительно экспрессируют мембранный маркер, выбранный из CD34, CD38, CD123, TIM3, CD25, CD32 и CD96.

41. Способ по любому из п.п. 37-40, в котором AML представляет собой остаточную минимальную болезнь (MRD).

42. Способ по п.41, в котором MRD отличается наличием или отсутствием мутации, выбранной из FLT3-ITD (внутренние тандемные дупликации (ITD) Fms-подобной тирозинкиназы-3), NPM1 (нуклеофосмин-1), DNMT3A (ДНК-метилтрансфераза ген DNMT3A), и IDH (изоцитратдегидрогеназа-1 и 2 (IDH1 и IDH2)).

43. Способ по п.37, в котором MDS выбирают из MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD), MDS с кольцевидными сидеробластами (MDS-RS), MDS с избытком бластов (MDS-EB), MDS с изолированной del(5q) и неклассифицируемого MDS (MDS-U).

44. Способ по п.37, в котором MDS представляет собой первичный MDS или вторичный MDS.

45. Способ по п.37, в котором ALL выбирают из B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и T-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL).

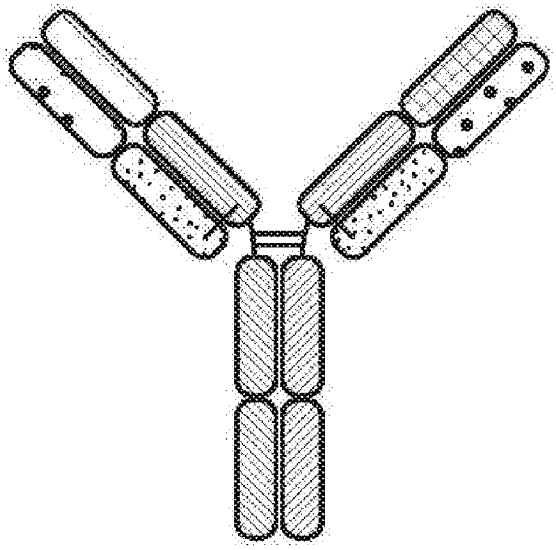
46. Способ по п.37, в котором MPN выбирают из истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии (ET) и миелофиброза.

47. Способ по п.37, в котором неходжкинскую лимфому выбирают из B-клеточной лимфомы и T-клеточной лимфомы.

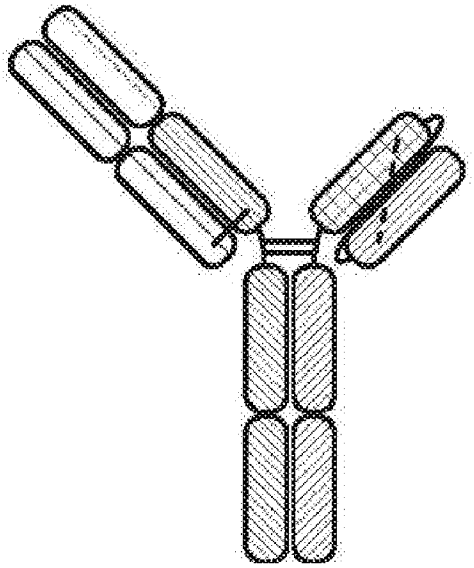
48. Способ по п.37, в котором лимфому выбирают из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфобластной лимфомы (LPL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (PMBL), фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, волосатоклеточныго лейкоза, плазмоклеточной миеломы (PCM) или множественной миеломы (MM), зрелых T/NK-новообразований и гистиоцитарных новообразований.

По доверенности

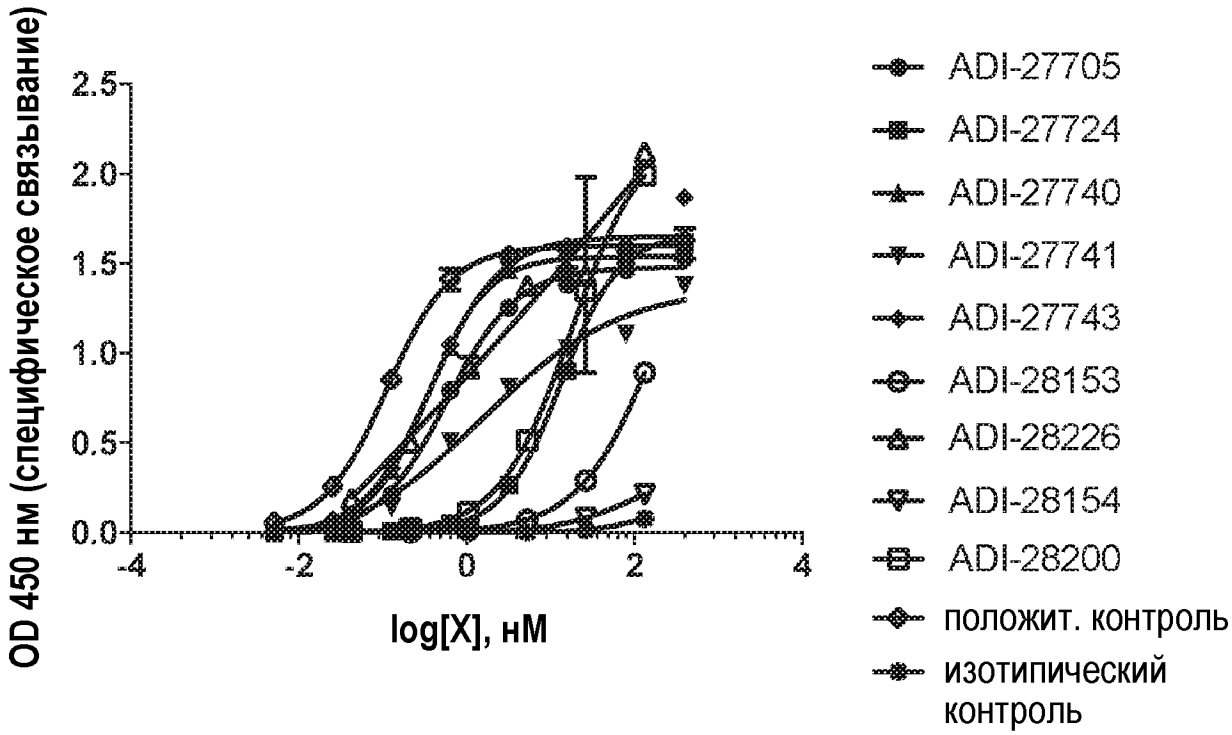
ФИГ.1



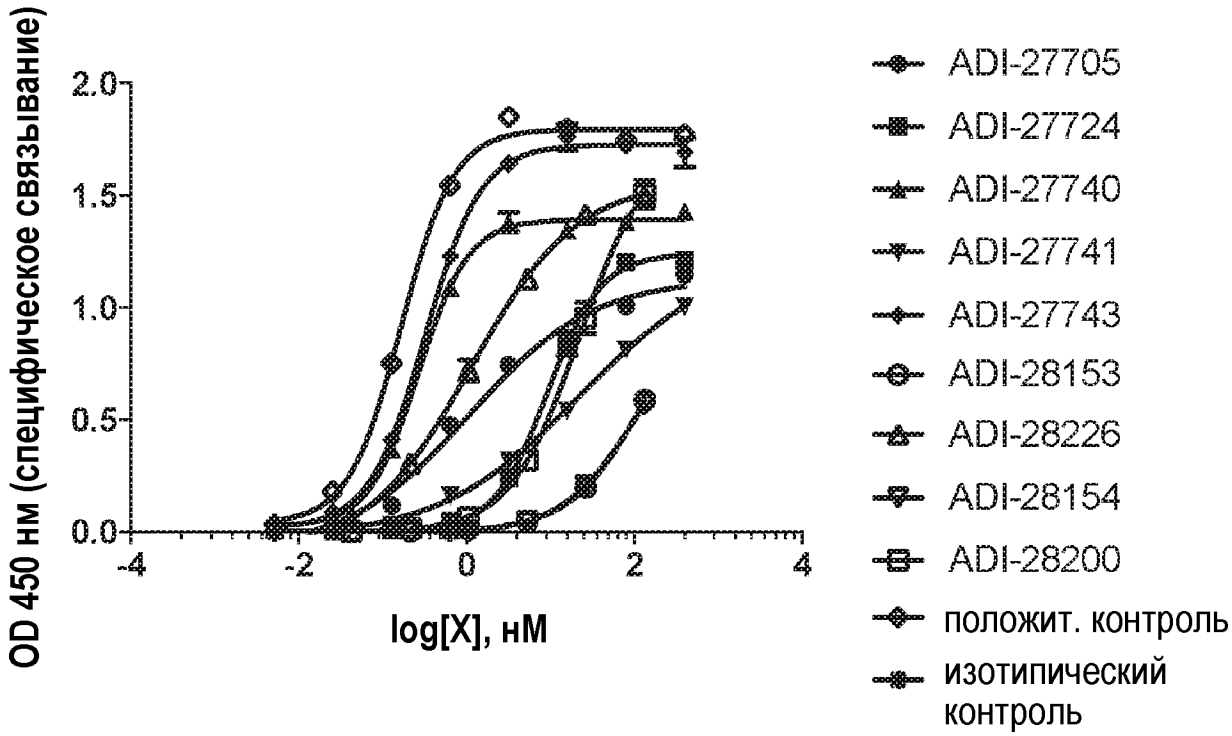
ФИГ.2



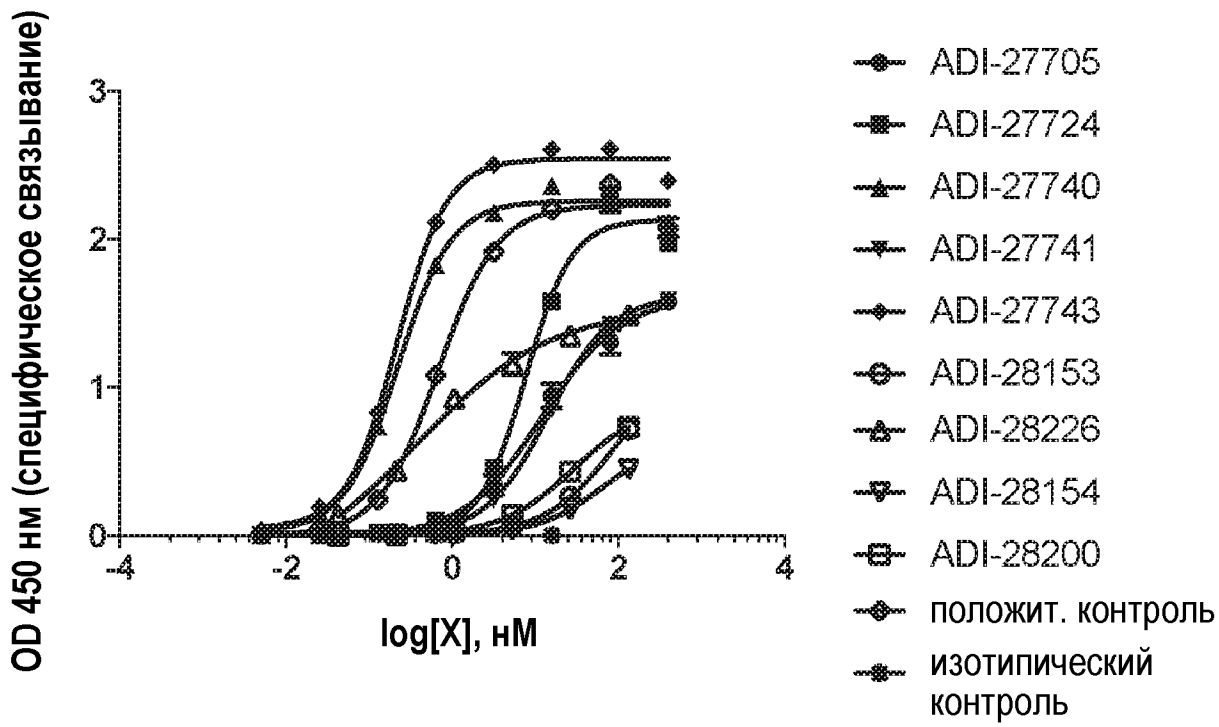
ФИГ.3


OD 450 нм (специфическое связывание)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-4
-2
0
2
4
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
положит. контроль
изотипический контроль

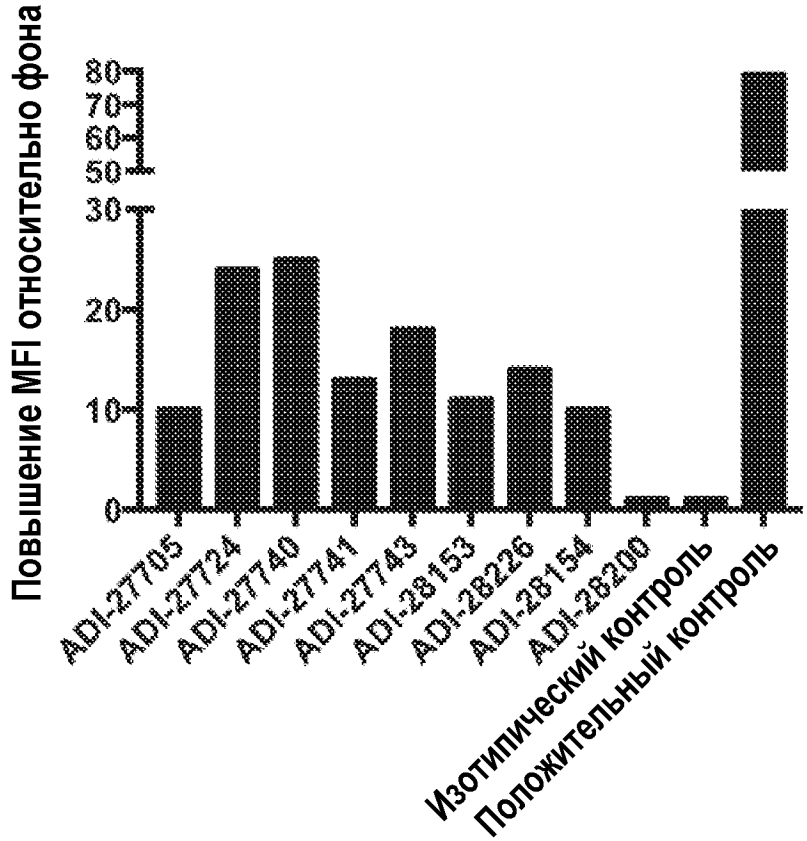
ФИГ.4


OD 450 нм (специфическое связывание)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-4
-2
0
2
4
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
положит. контроль
изотипический контроль

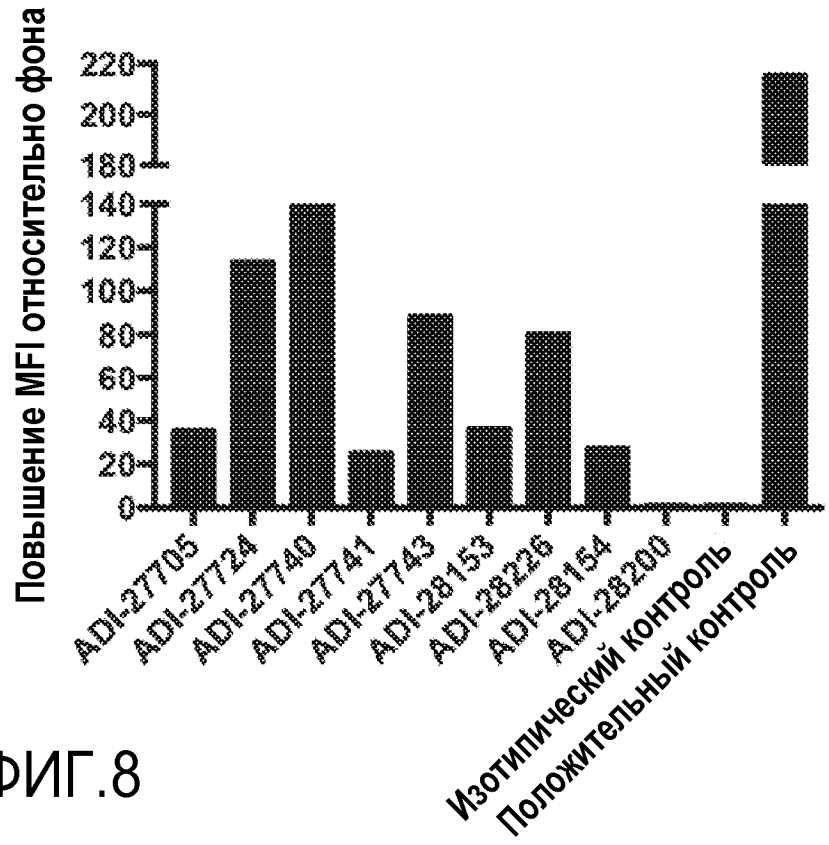
ФИГ.5


OD 450 нм (специфическое связывание)
3
2
1
0
-4
-2
0
2
4
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
положит. контроль
изотипический контроль

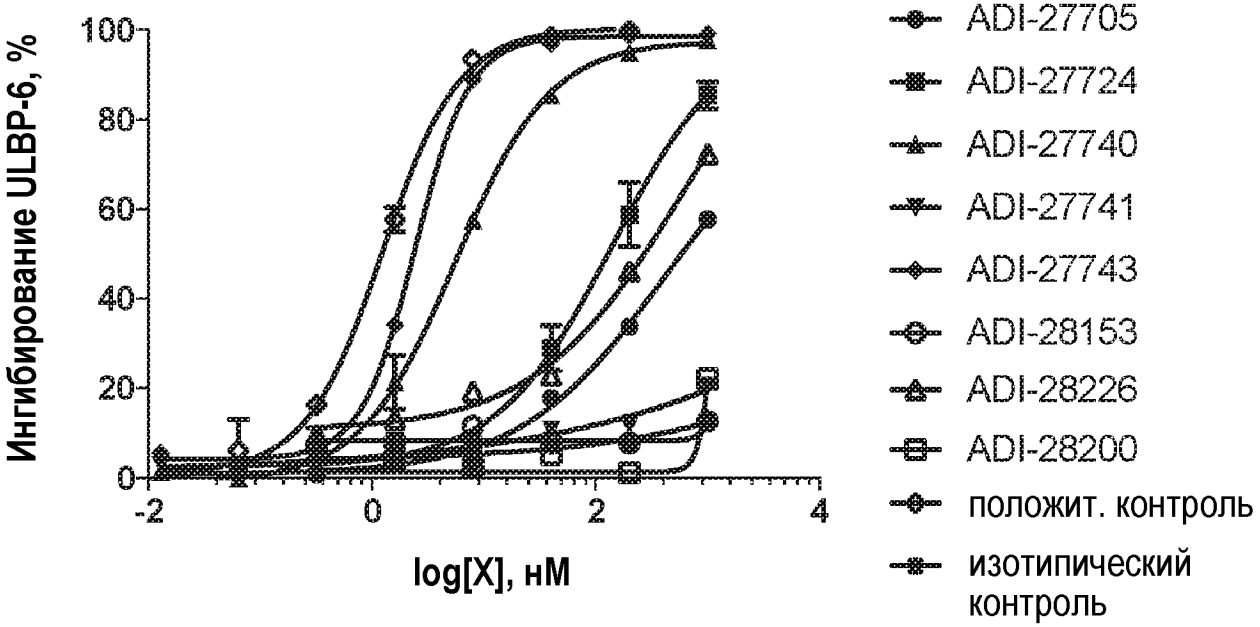
ФИГ.6


Повышение MFI относительно фона
80
70
60
50
30
20
10
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

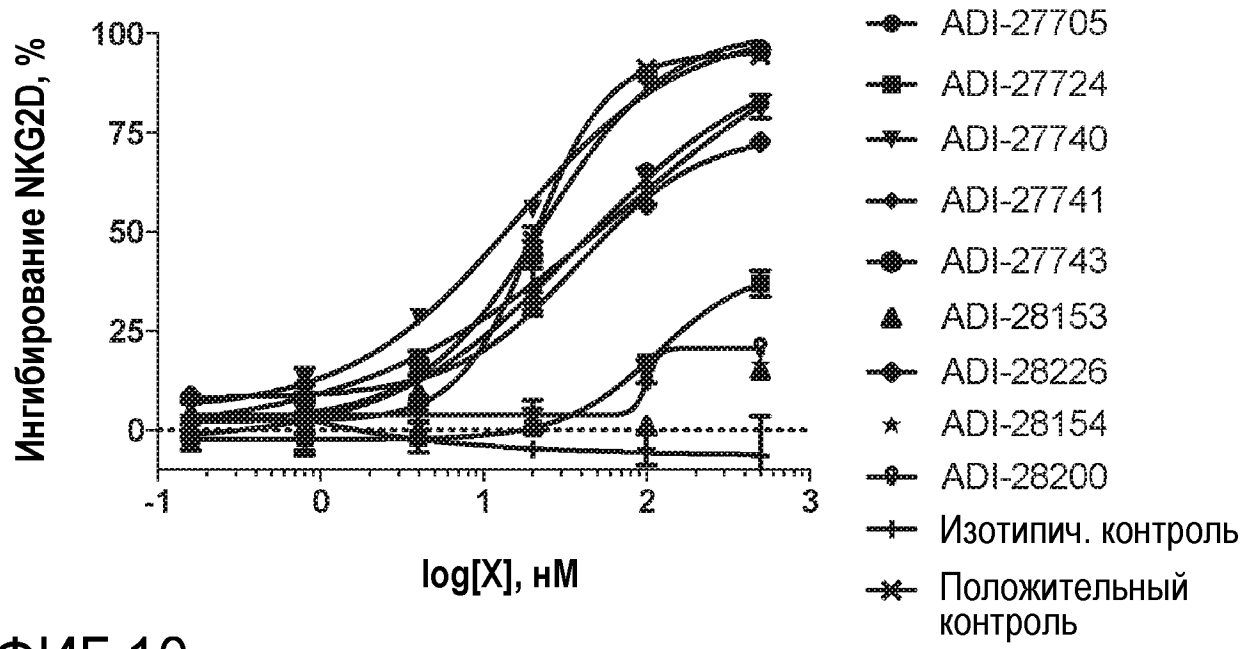
ФИГ.7


Повышение MFI относительно фона
220
200
180
140
120
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

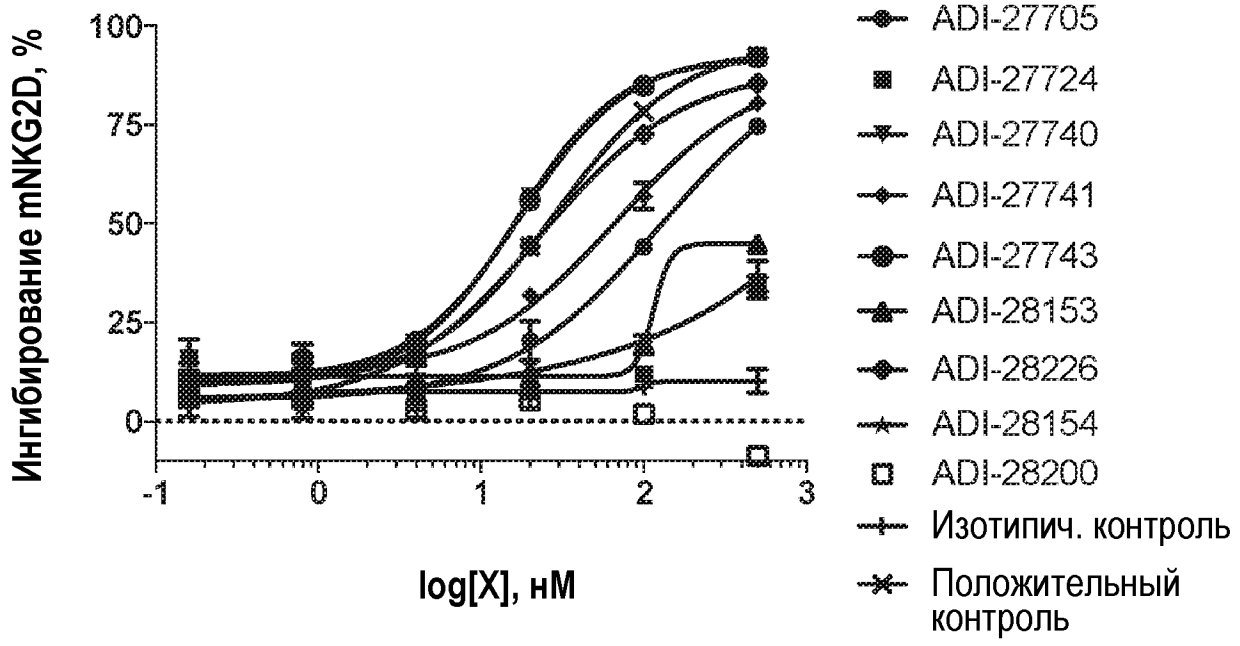
ФИГ.8


Ингибирование ULBP-6, %
100
80
60
40
20
0
-2
0
2
4
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28200
положит. контроль
изотипический контроль

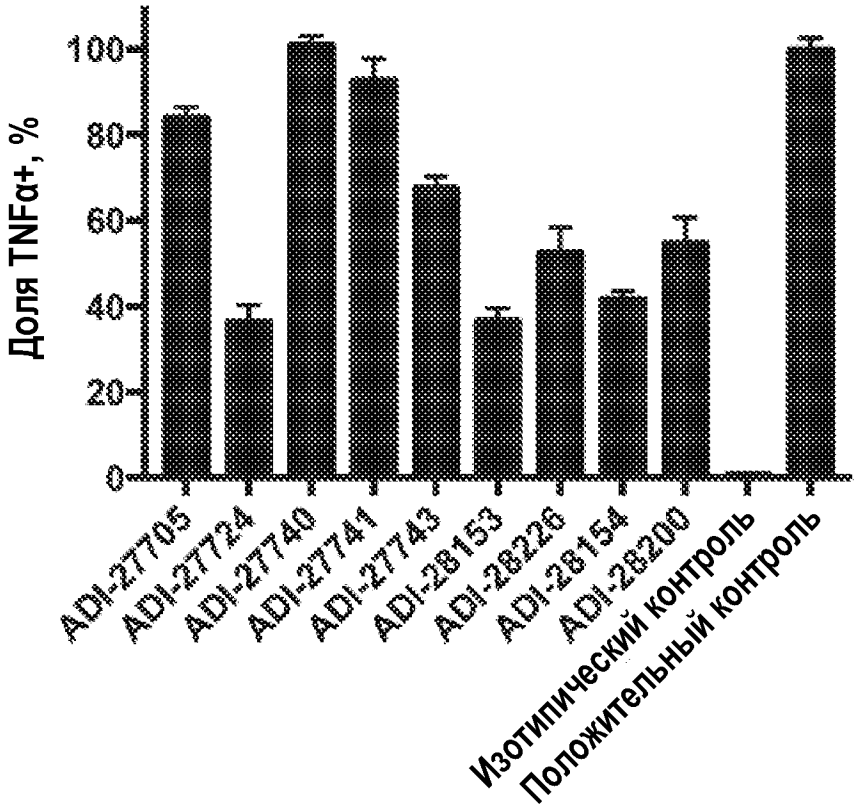
ФИГ.9


Ингибирование NKG2D, %
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипич. контроль
Положительный контроль

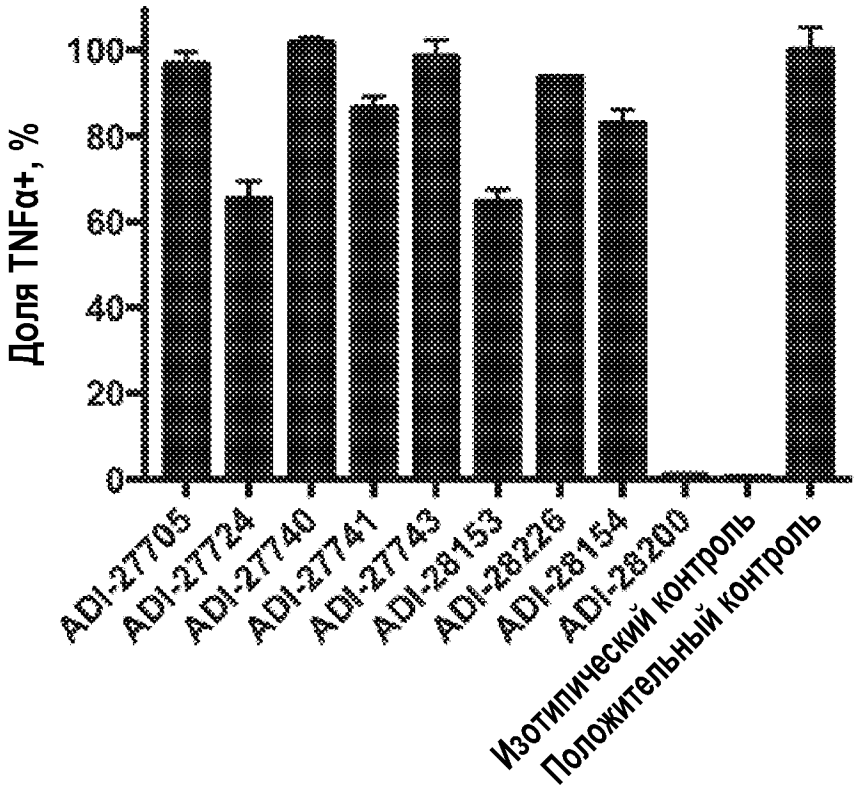
ФИГ.10


Ингибирование mNKG2D, %
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
log[X], нМ
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипич. контроль
Положительный контроль

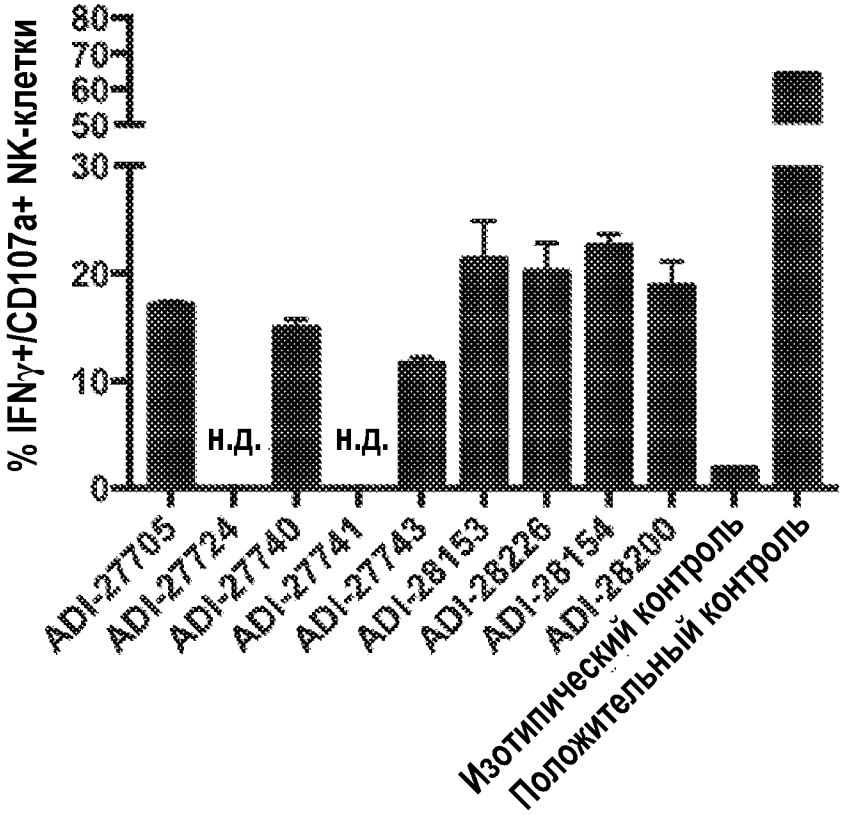
ФИГ.11


Доля TNFα+, %
0
20
40
60
80
100
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

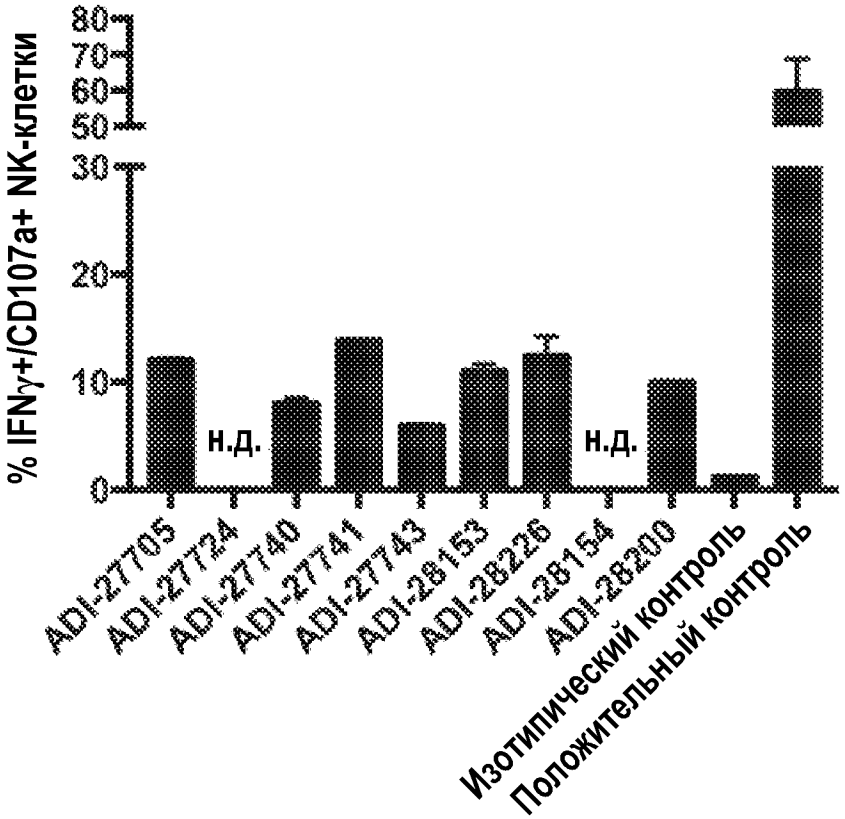
ФИГ.12


Доля TNFα+, %
0
20
40
60
80
100
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

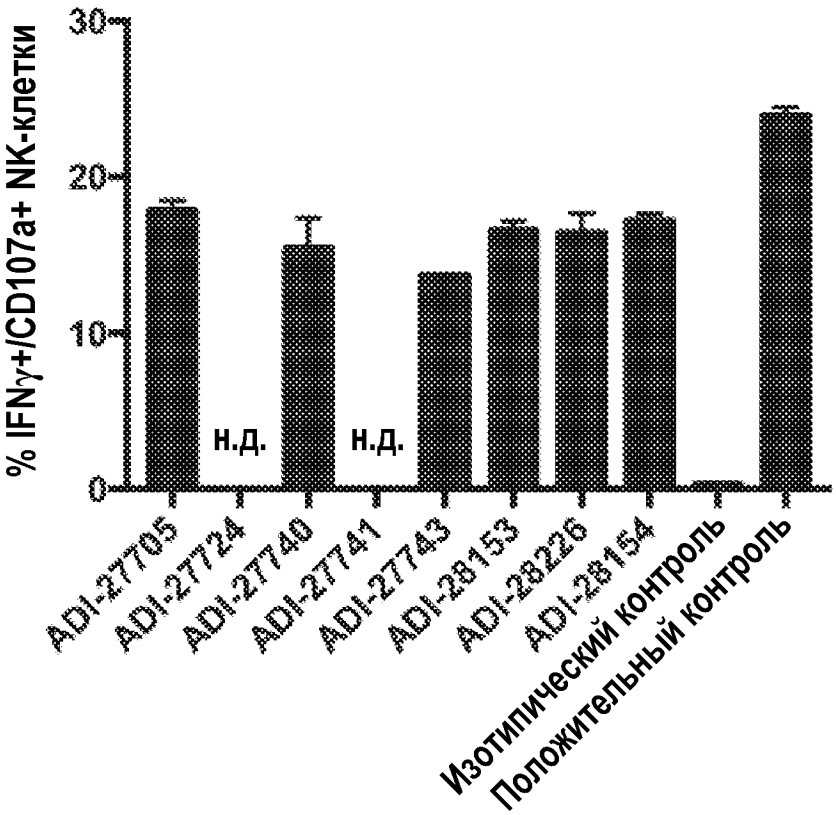
ФИГ.13


% IFNγ+/CD107a+ NK-клетки
80
70
60
50
30
20
10
0
н.д.
н.д.
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

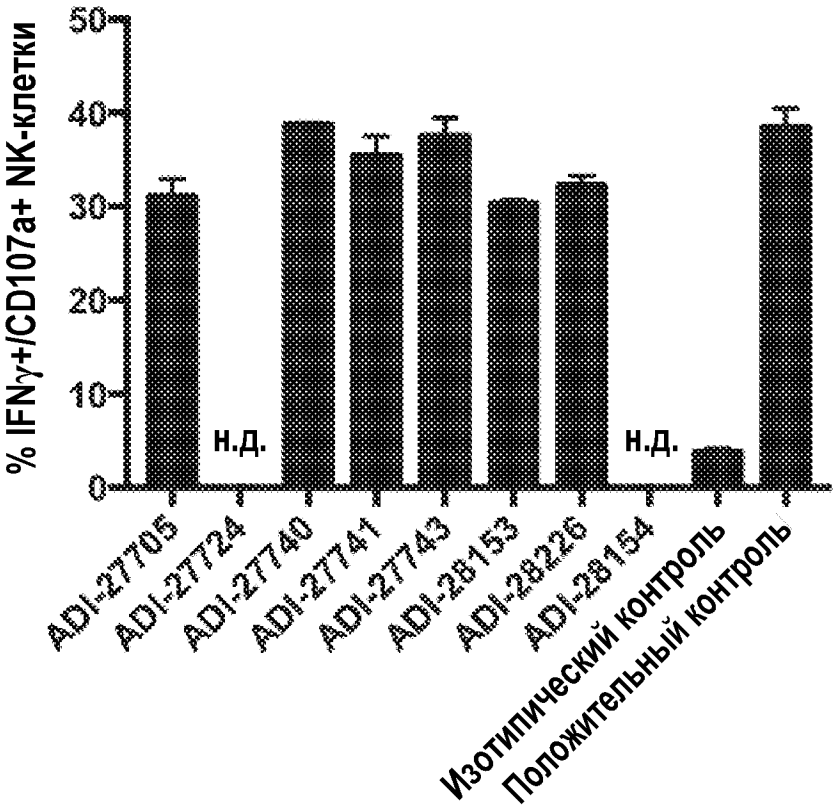
ФИГ.14


% IFNγ+/CD107a+ NK-клетки
80
70
60
50
30
20
10
0
н.д.
н.д.
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
ADI-28200
Изотипический контроль
Положительный контроль

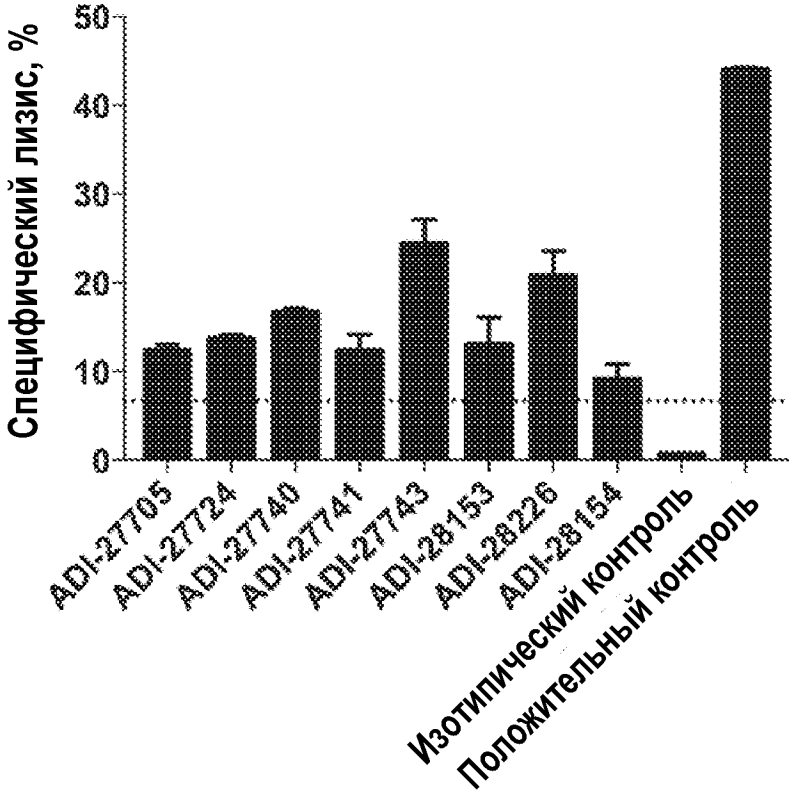
ФИГ.15


% IFNγ+/CD107a+ NK-клетки
30
20
10
0
н.д.
н.д.
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Изотипический контроль
Положительный контроль

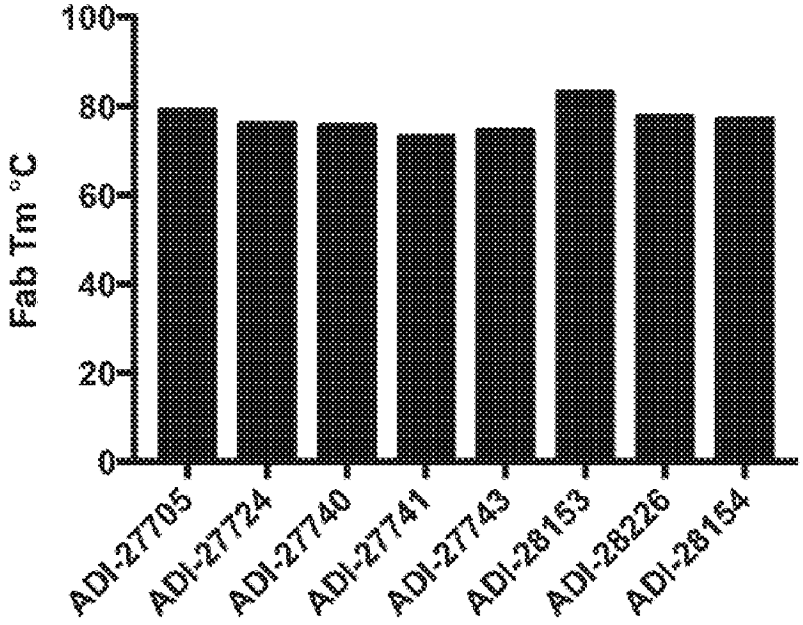
ФИГ.16


% IFNγ+/CD107a+ NK-клетки
50
40
30
20
10
0
н.д.
н.д.
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Изотипический контроль
Положительный контроль

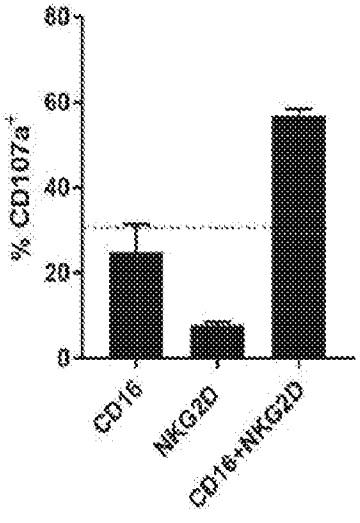
ФИГ.17


Специфический лизис, %
50
40
30
20
10
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154
Изотипический контроль
Положительный контроль

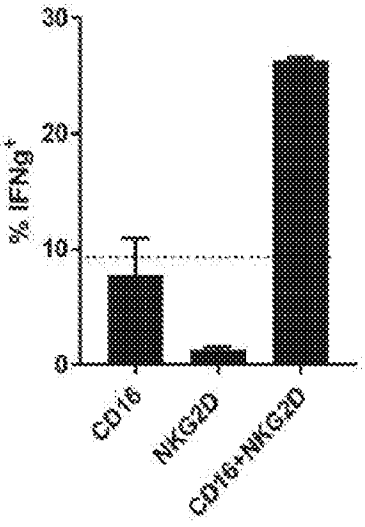
ФИГ.18


Fab Tm °C
100
80
60
40
20
0
ADI-27705
ADI-27724
ADI-27740
ADI-27741
ADI-27743
ADI-28153
ADI-28226
ADI-28154

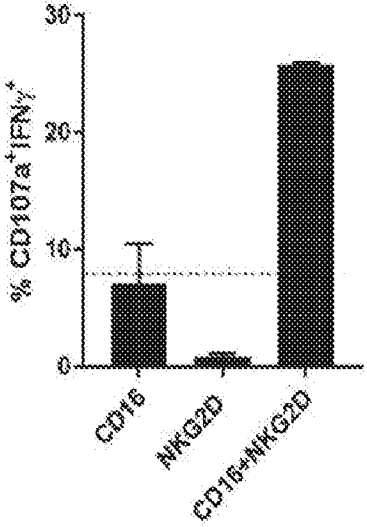
ФИГ.19A



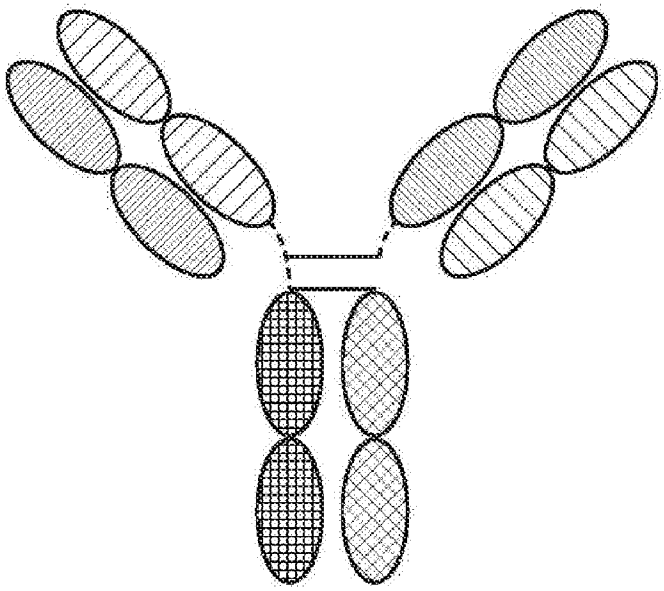
ФИГ.19B



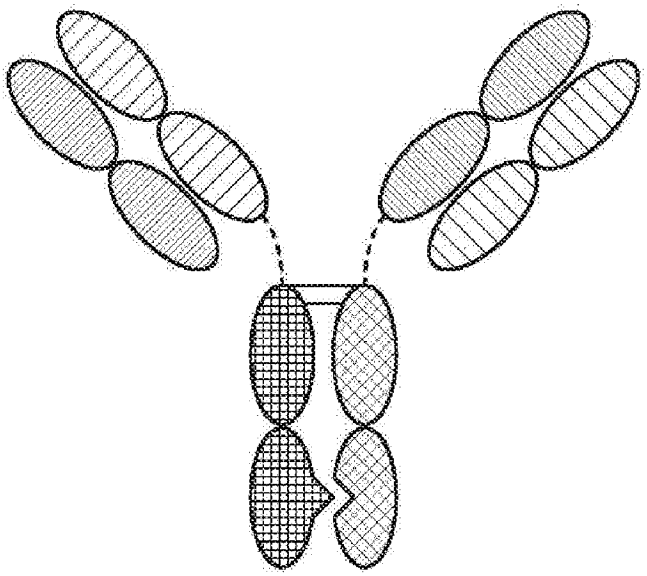
ФИГ.19C



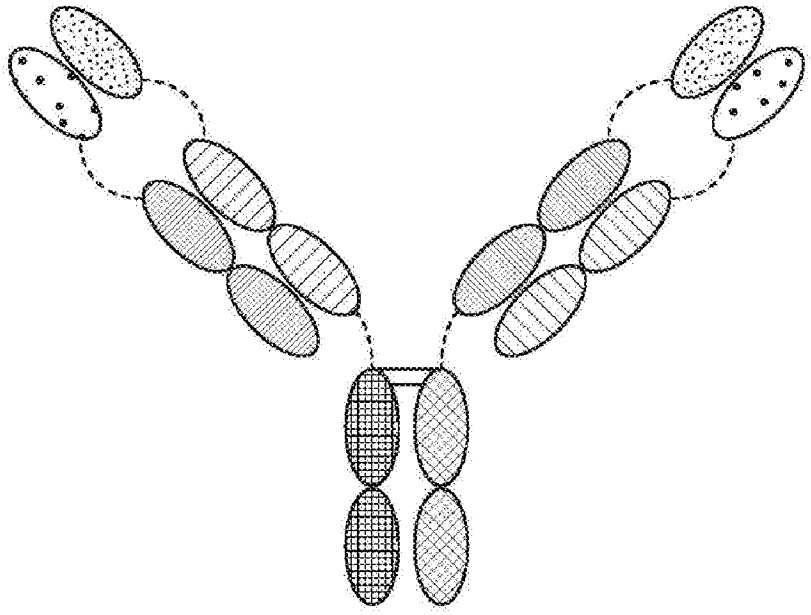
ФИГ.20



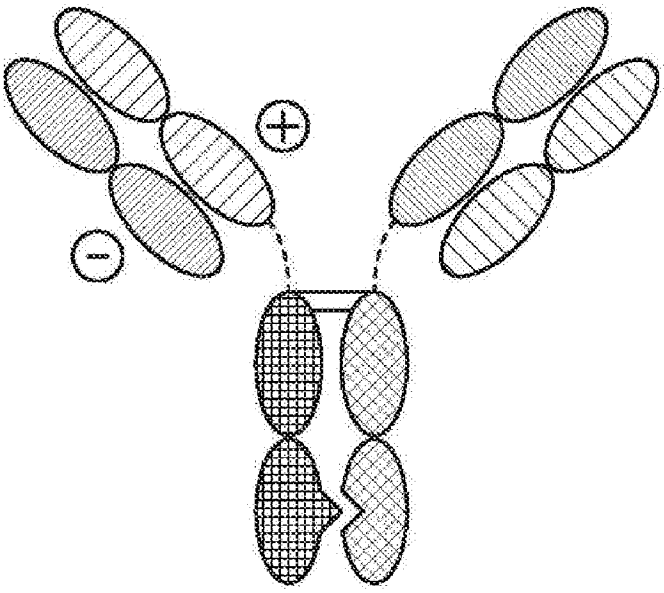
ФИГ.21



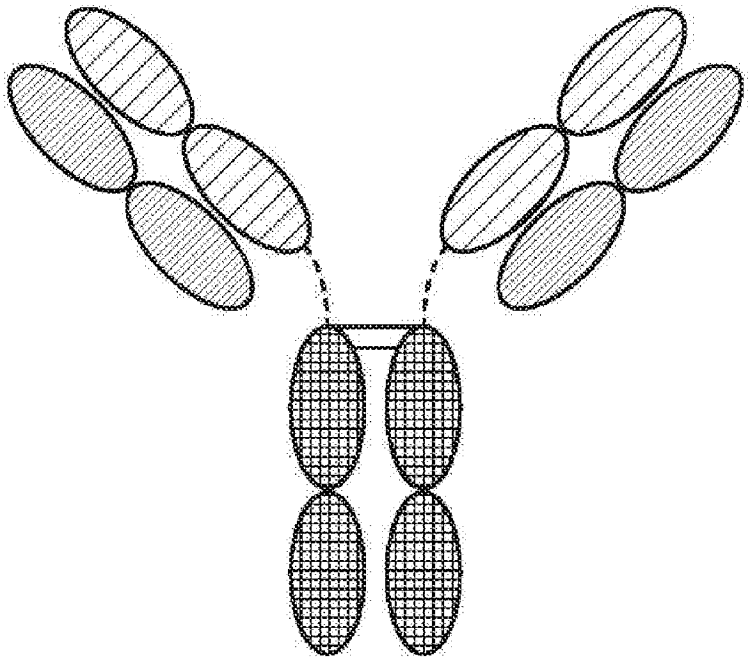
ФИГ.22



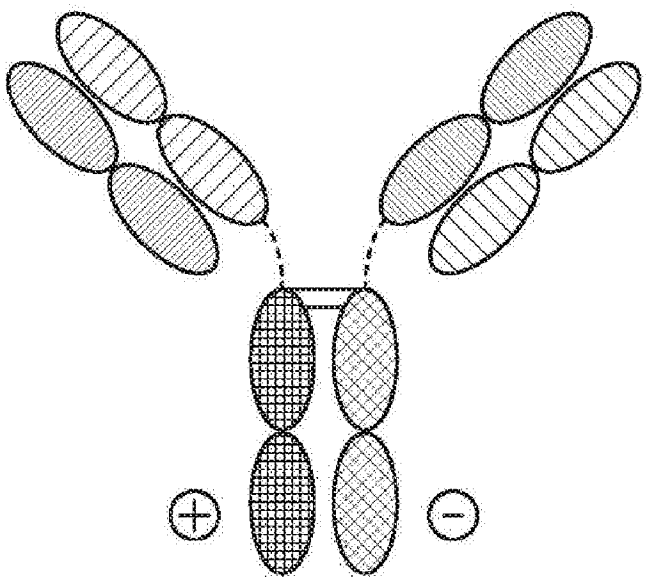
ФИГ.23



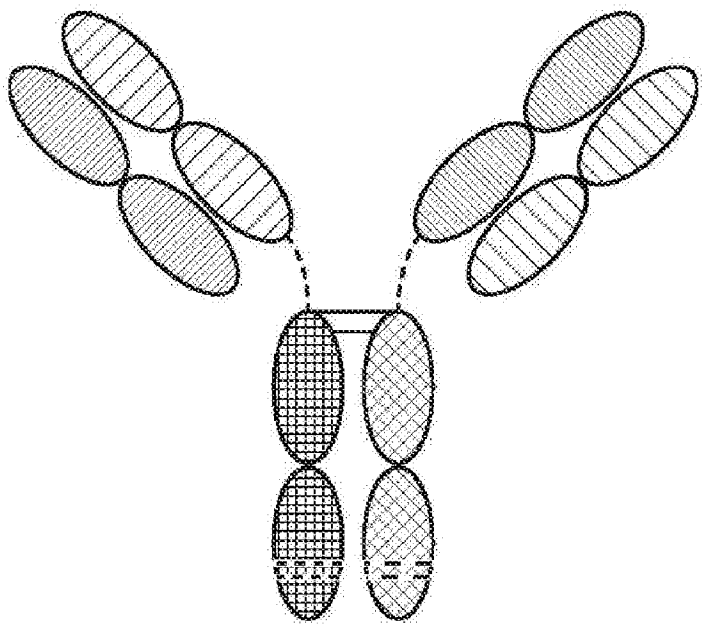
ФИГ.24



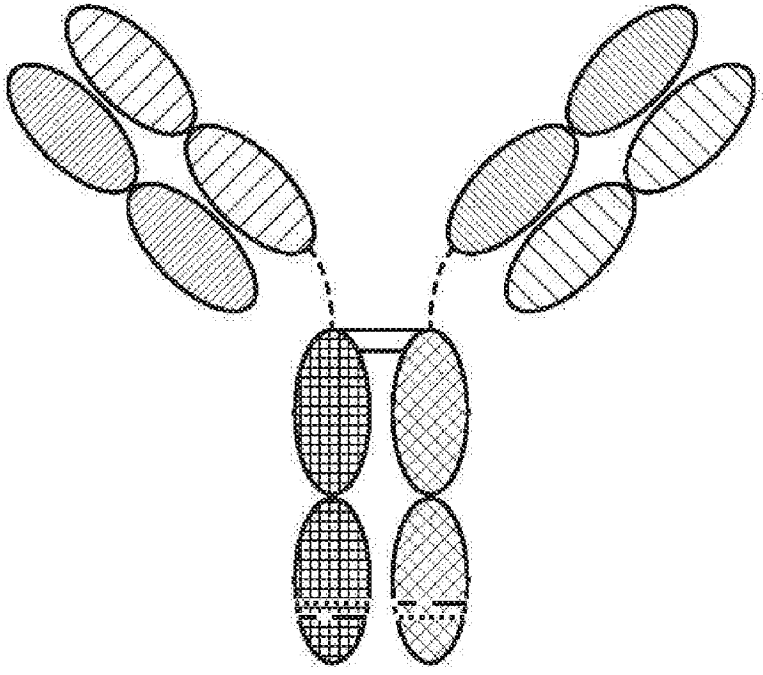
ФИГ.25



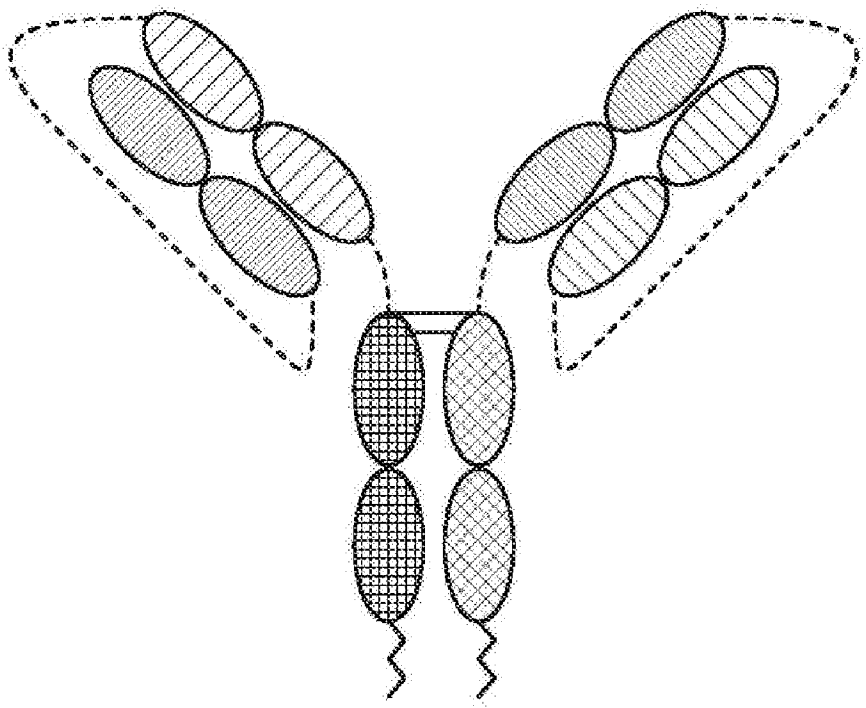
ФИГ.26



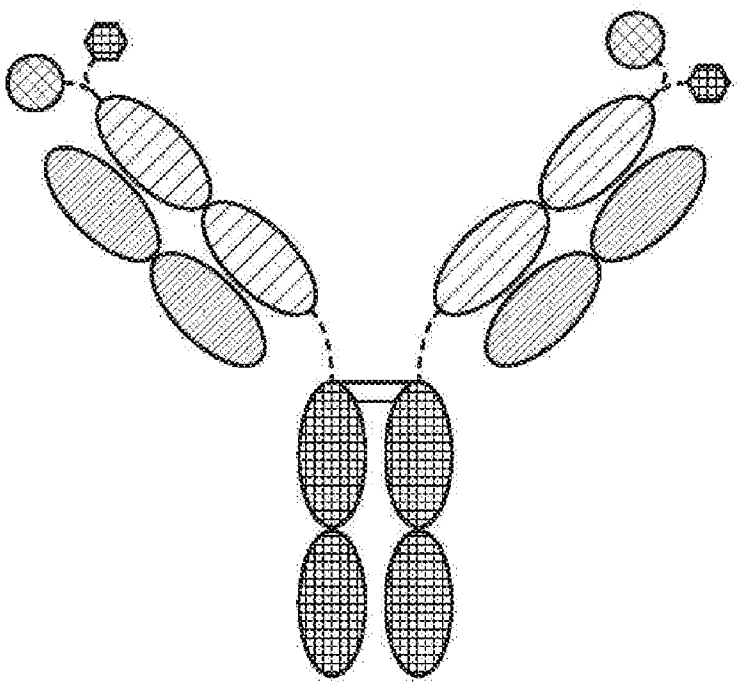
ФИГ.27



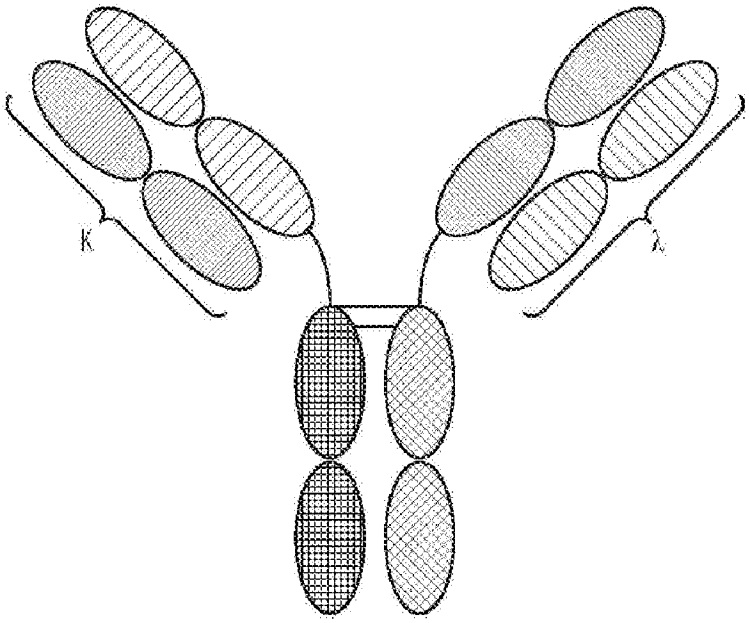
ФИГ.28



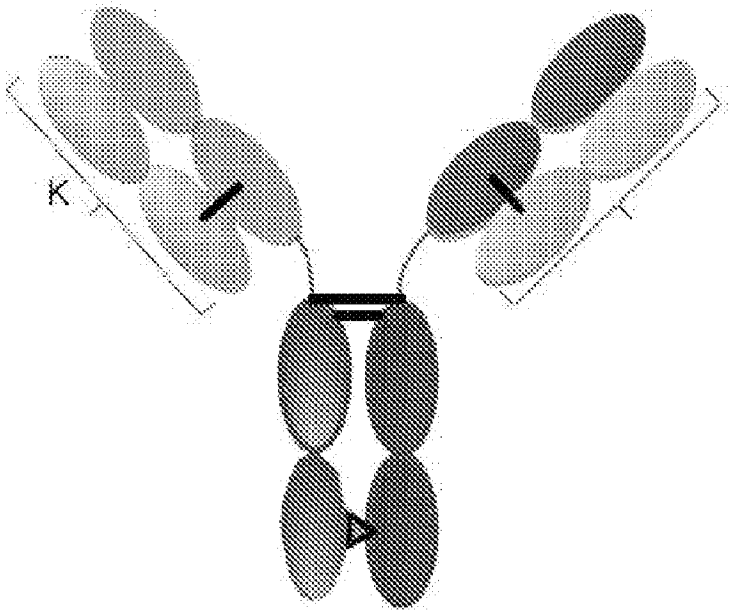
ФИГ.29



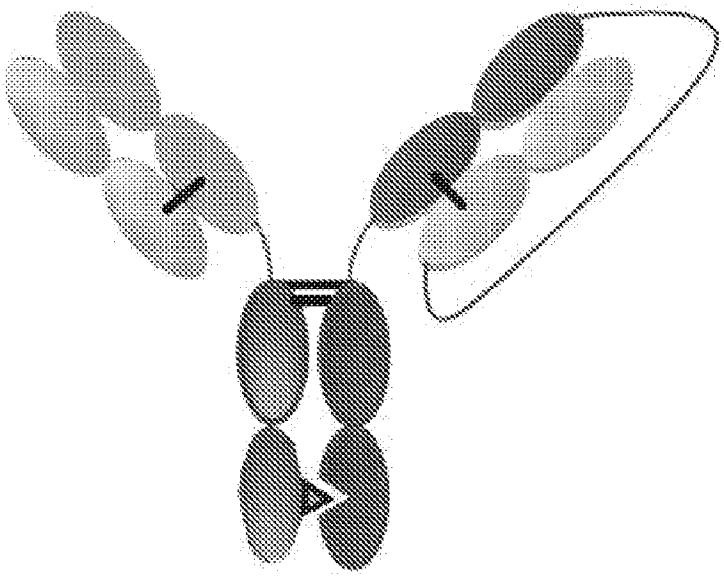
ФИГ.30А



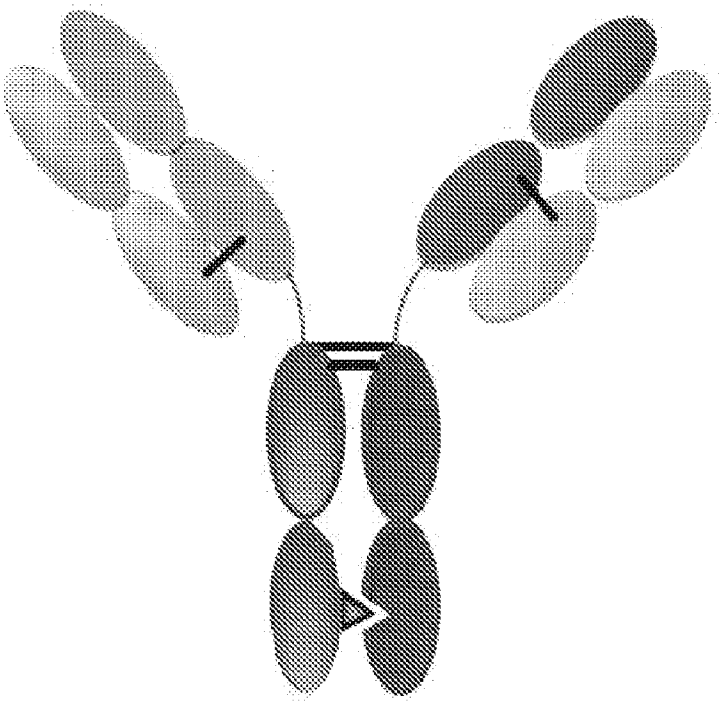
ФИГ.30В



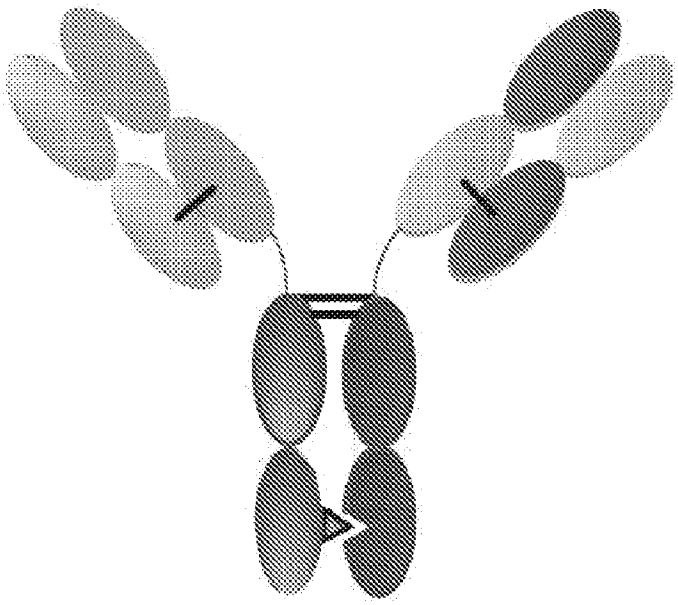
ФИГ.31



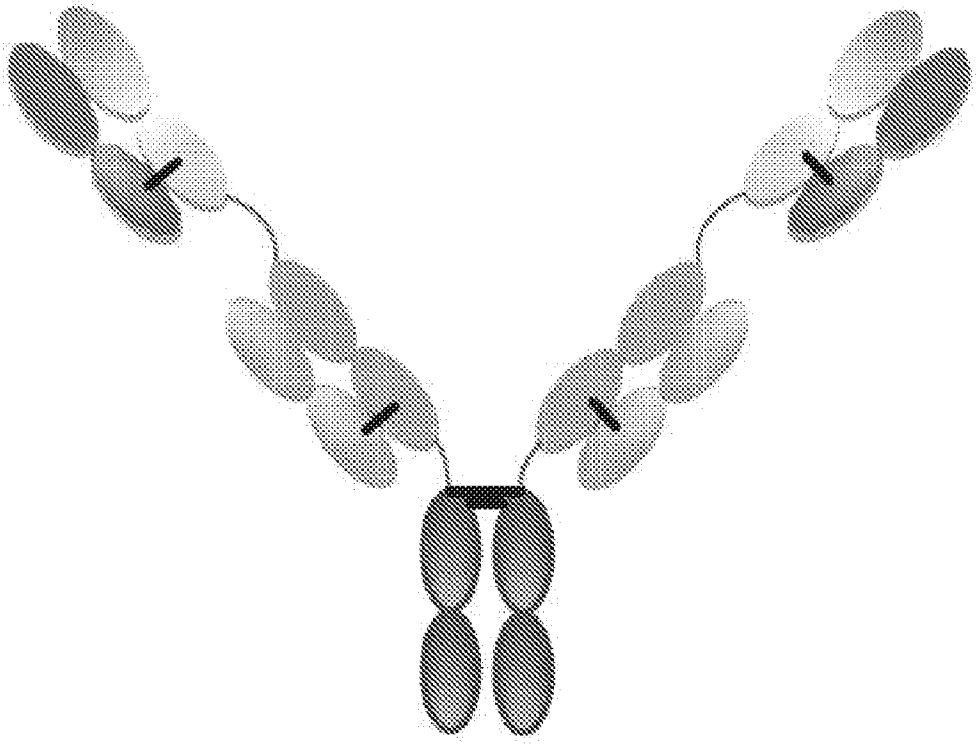
ФИГ.32



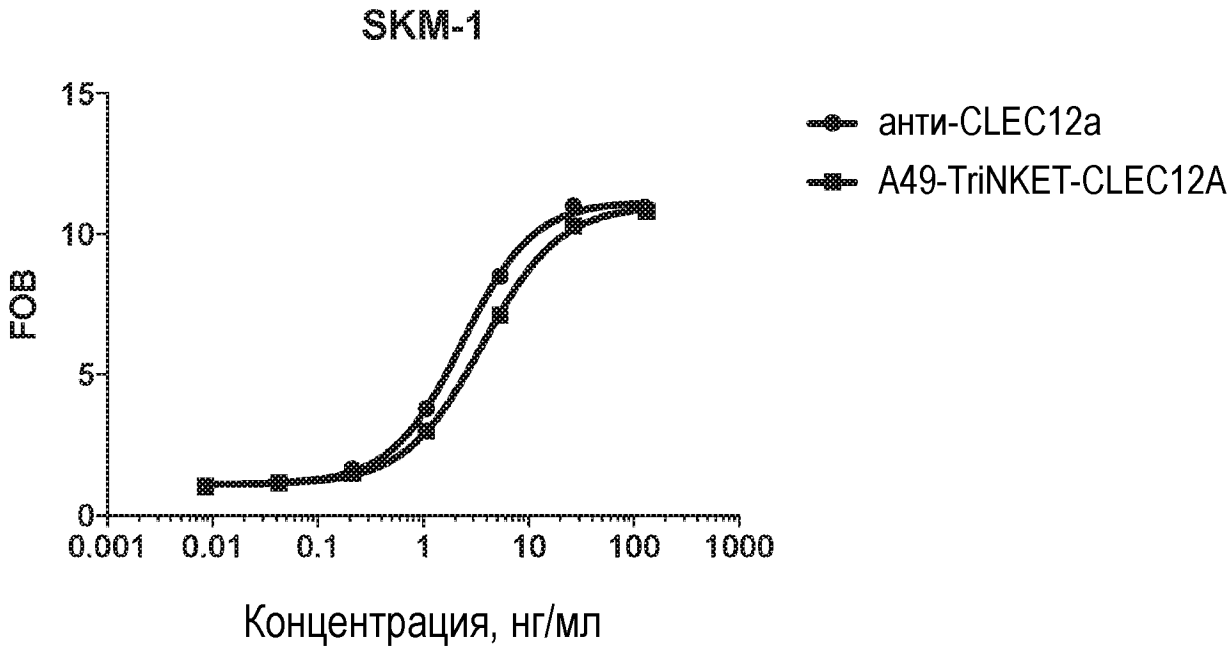
ФИГ.33



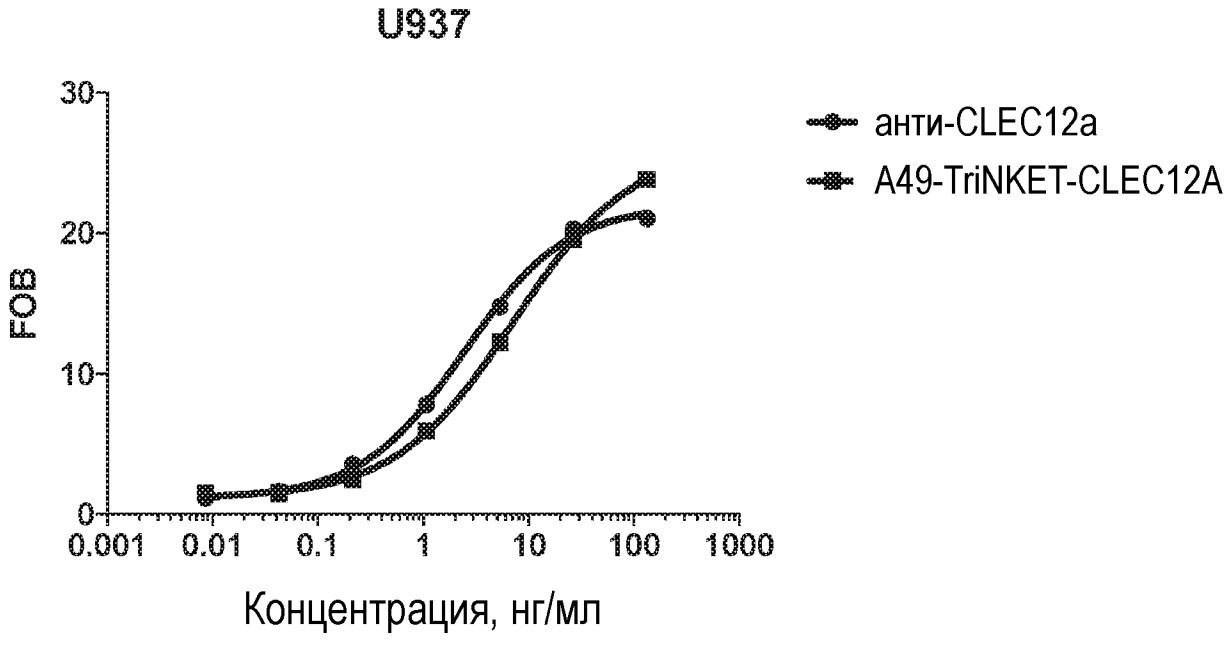
ФИГ.34



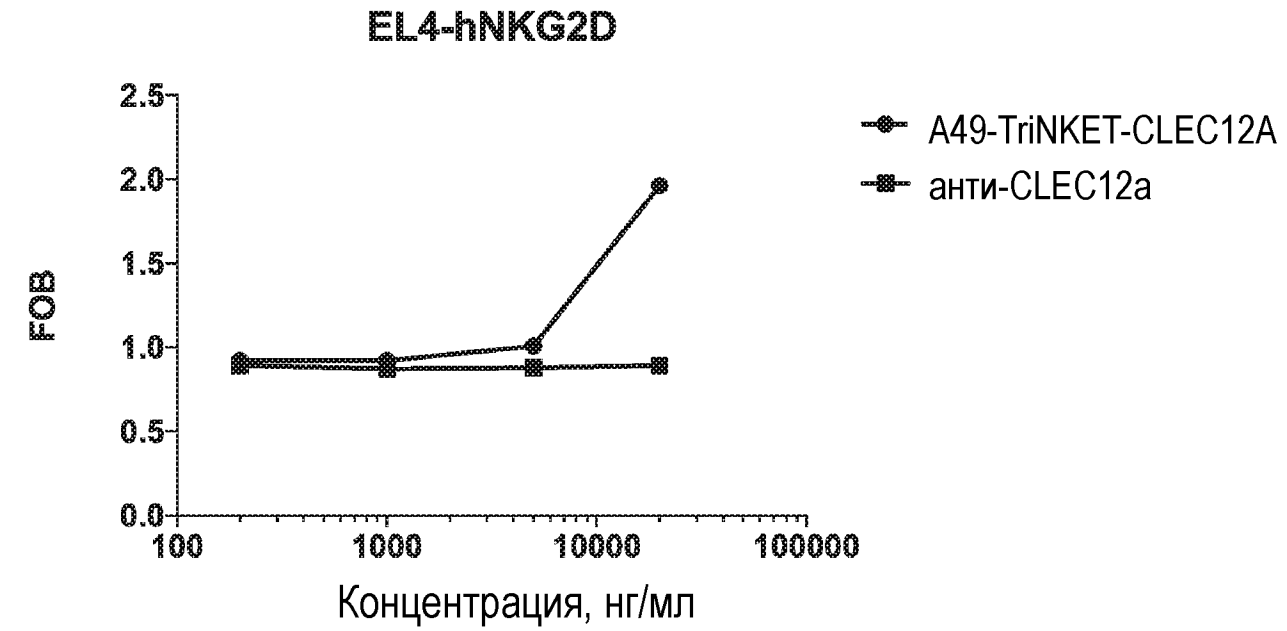
ФИГ.35


SKM-1
FOB
15
10
5
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Концентрация, нг/мл
анти-CLEC12a
A49-TriNKET-CLEC12A

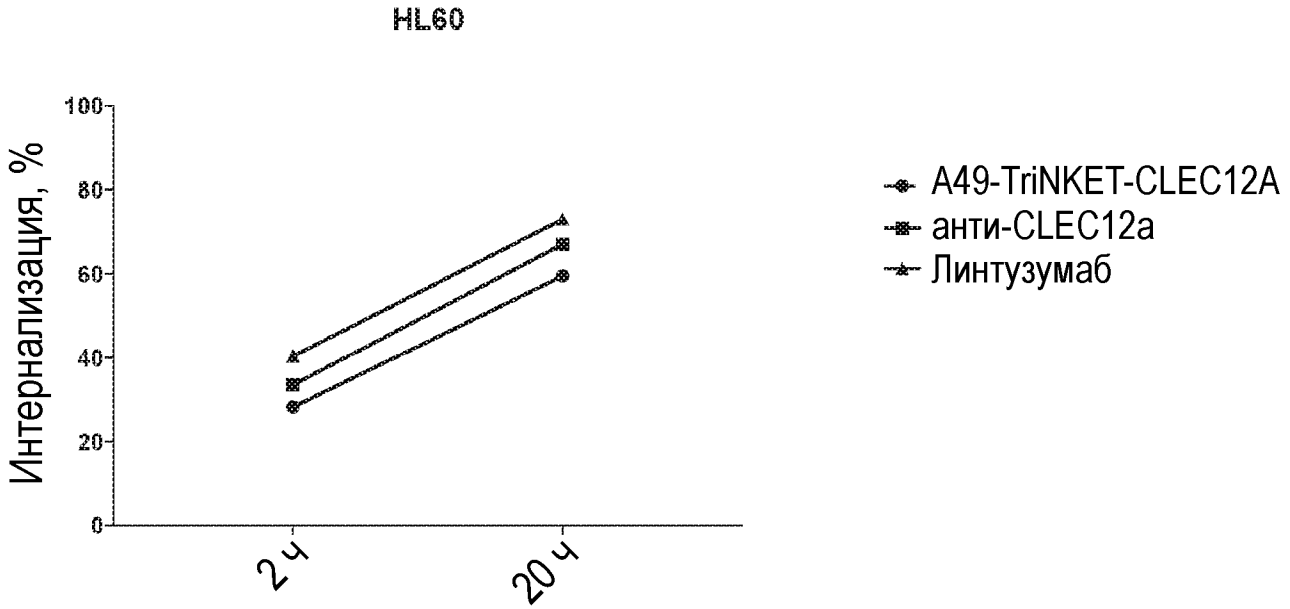
ФИГ.36


U937
FOB
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Концентрация, нг/мл
анти-CLEC12a
A49-TriNKET-CLEC12A

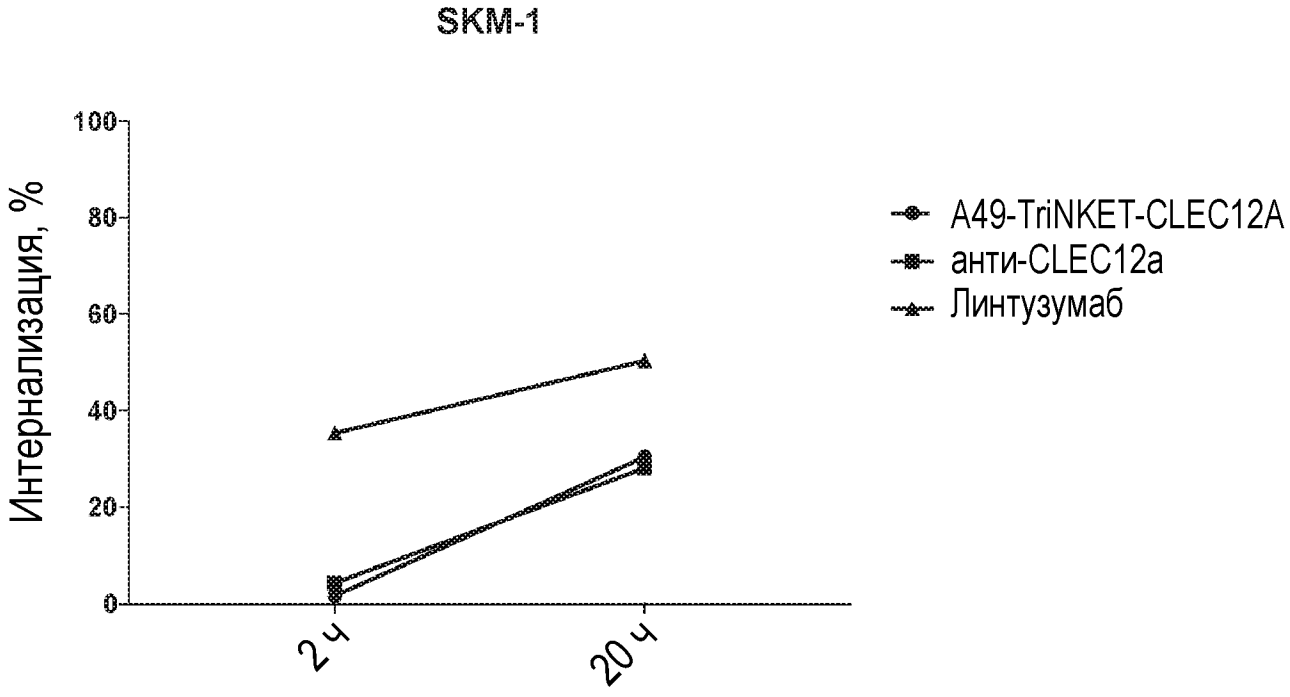
ФИГ.37


EL4-hNKG2D
FOB
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100
1000
10000
100000
Концентрация, нг/мл
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a

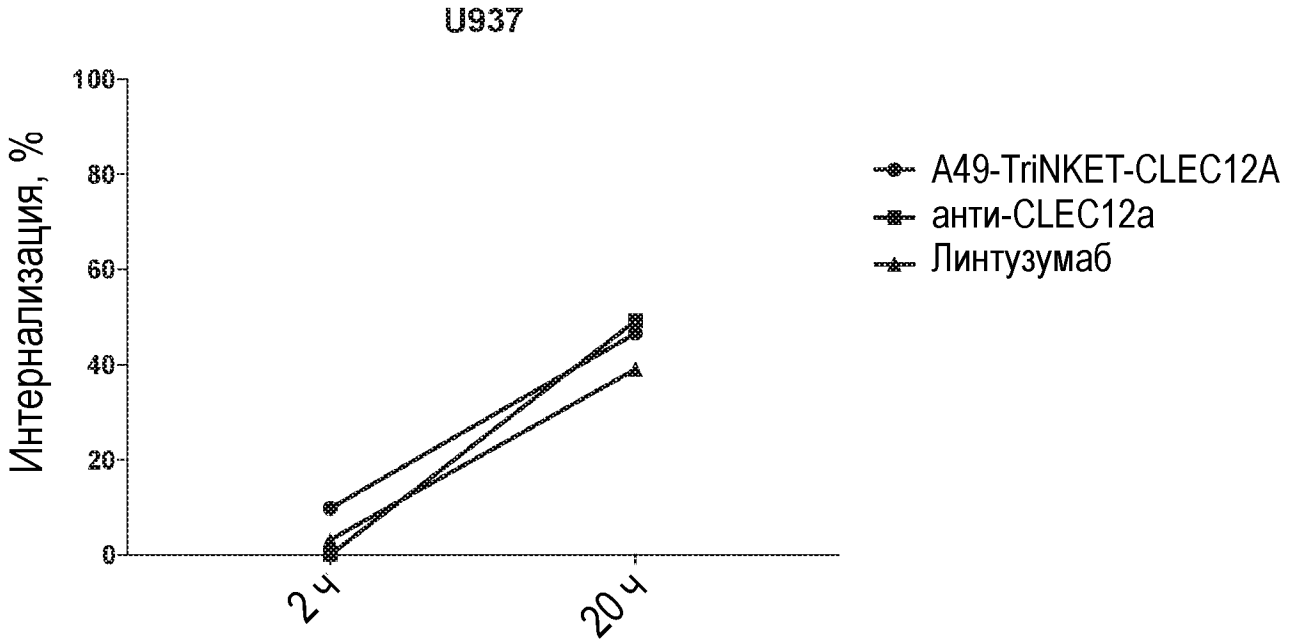
ФИГ.38


HL60
Интернализация, %
100
80
60
40
20
0
2 ч
20 ч
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a
Линтузумаб

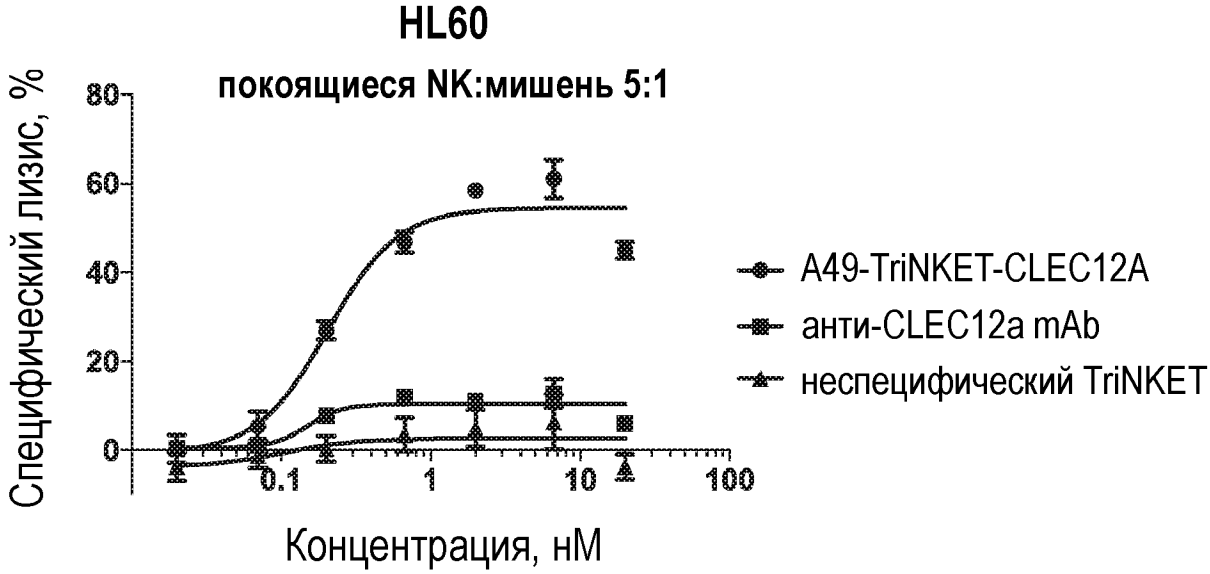
ФИГ.39


SKM-1
Интернализация, %
100
80
60
40
20
0
2 ч
20 ч
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a
Линтузумаб

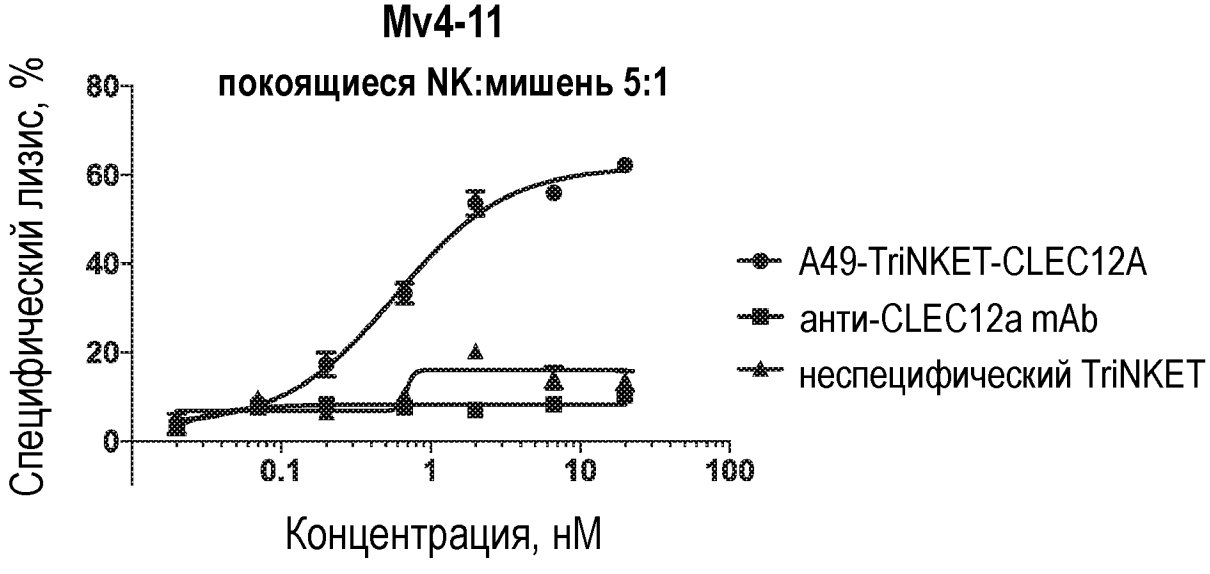
ФИГ.40


U937
Интернализация, %
100
80
60
40
20
0
2 ч
20 ч
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a
Линтузумаб

ФИГ.41


HL60
покоящиеся NK:мишень 5:1
Специфический лизис, %
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Концентрация, нМ
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a mAb
неспецифический TriNKET

ФИГ.42


Mv4-11
покоящиеся NK:мишень 5:1
Специфический лизис, %
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Концентрация, нМ
A49-TriNKET-CLEC12A
анти-CLEC12a mAb
неспецифический TriNKET