

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091888 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.23

(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.08

(54) ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ АНТИТЕЛ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА РЕЦЕПТОР NKG2D

(31) 62/628,161; 62/716,259

(72) Изобретатель:

(32) 2018.02.08; 2018.08.08

Чан Грегори П., Чеунг Энн Ф.,
Гринберг Ася, Хани Уилльям, Лунде
Брэдли М., Принц Бьянка (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/017330

(87) WO 2019/157366 2019.08.15

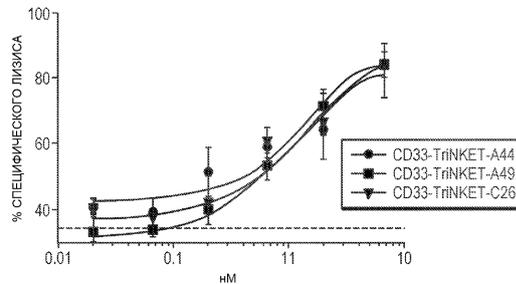
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны переменные домены тяжелой цепи антитела, которые могут быть спарены с переменными доменами легкой цепи антитела с образованием антигенсвязывающего участка, нацеленного на рецептор NKG2D на поверхности естественных клеток-киллеров. Также описаны белки, содержащие участок, связывающий антиген NKG2D, фармацевтические композиции, содержащие их, и способы лечения, в том числе лечения рака.



A1

202091888

202091888

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564234EA/085

ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ АНТИТЕЛ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА РЕЦЕПТОР NKG2D ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет предварительной заявки на патент США № 62/628161, поданной 8 февраля 2018 года, раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки во всей ее полноте для всех целей; и предварительной заявки на патент США № 62/716259, поданной 8 августа 2018 года.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] В настоящем изобретении предлагаются белки с вариabельными доменами тяжелой цепи и легкой цепи антитела, которые могут быть спарены для образования антигенсвязывающего участка, нацеленного на рецептор 2D группы естественных киллеров (NKG2D) на поверхности естественных клеток-киллеров, фармацевтические композиции, содержащие такие белки, и терапевтические способы с использованием таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Рак продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на значительные исследовательские усилия и научные достижения, сообщаемые в литературе по лечению этого заболевания. Некоторые из наиболее часто диагностируемых видов рака включают рак простаты, рак молочной железы и рак легких. Рак простаты является наиболее распространенной формой рака у мужчин. Рак молочной железы остается основной причиной смерти у женщин. Текущие варианты лечения этих видов рака не эффективны для всех пациентов и/или могут иметь существенные побочные эффекты. Другие виды рака также остаются сложными для лечения с использованием существующих вариантов лечения.

[4] Противораковые иммунотерапевтические агенты являются желательными по причине их высокоспецифичности и возможности способствовать разрушению раковых клеток с использованием собственной иммунной системы пациента. Слитые белки, такие как биспецифические Т-клеточные рекрутеры, представляют собой противораковые иммунотерапевтические агенты, описанные в литературе, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. Антитела, которые связываются с определенными опухоль-ассоциированными антигенами и с определенными иммунными клетками, описаны в литературе. См, например, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

[5] Естественные клетки-киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют примерно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки проникают практически во все ткани и первоначально характеризовались своей способностью эффективно убивать опухолевые клетки без необходимости примирования, что отличает их от Т-клеток. Активированные NK-клетки убивают клетки-мишени аналогично цитотоксическим Т-клеткам, *то есть* через цитолитические гранулы, которые

содержат перфорин и гранзимы, а также через пути рецепторов смерти. Активированные НК-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN-гамма и хемокины, которые способствуют привлечению других лейкоцитов в ткани-мишени.

[6] НК-клетки реагируют на сигналы через различные активирующие и ингибирующие рецепторы на своей поверхности. Например, когда НК-клетки встречаются с здоровыми аутоклетками, их активность ингибируется активацией иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KIR). Альтернативно, когда НК-клетки встречаются с раковыми клетками, они активируются через свои активирующие рецепторы (*например*, NKG2D, NCRs, DNAM1). НК-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на их поверхности. Общая чувствительность НК-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов. NKG2D является трансмембранным белком II типа, который экспрессируется по существу всеми естественными клетками-киллерами, где NKG2D служит активирующим рецептором. Способность модулировать функцию НК-клеток с помощью NKG2D полезна в различных терапевтических контекстах, включая злокачественную опухоль.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Были идентифицированы антитела к NKG2D, которые обеспечивают важные преимущества при разработке терапевтических агентов. Например, некоторые из этих антител не просто связывают рецептор NKG2D человека, но имеют одно или более дополнительных преимуществ, таких как способность агонизировать рецептор; способность конкурировать с природным лигандом за связывание с рецептором; и/или способность перекрестно реагировать с NKG2D от других видов, таких как яванский макак. Данные преимущества могут быть достигнуты через ряд аффинностей к NKG2D.

[8] Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к переменному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:1, ADI-29379). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности YTFTSYMH (SEQ ID NO: 11) в качестве первой определяющей комплементарности области 1 («CDR1»), IINPSGGSTSYAQKFGQ (SEQ ID NO: 12) в качестве второй CDR («CDR2») и ARGAPNYGDTTHDYYMDV (SEQ ID NO: 13) в качестве третьей CDR («CDR3») SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SYMH (SEQ ID NO: 45) в качестве CDR1, IINPSGGSTSYAQKFGQ (SEQ ID NO: 12) в качестве CDR2 и GAPNYGDTTHDYYMDV (SEQ ID NO: 68) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 1.

[9] Другой аспект настоящего изобретения относится к варибельному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3, ADI-29463). В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности YTFTGYYMH (SEQ ID NO: 17) в качестве первой определяющей комплементарности области («CDR1»), WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 18) в качестве второй CDR («CDR2») и ARDTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO: 19) в качестве третьей CDR («CDR3») SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности GYYMH (SEQ ID NO: 92) в качестве CDR1, WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 18) в качестве CDR2 и DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO: 69) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 3.

[10] Другой аспект настоящего изобретения относится к варибельному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGL
TVTVSS (SEQ ID NO:5, ADI-27744). В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 23) в качестве первой определяющей комплементарности области («CDR1»), AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 24) в качестве второй CDR («CDR2») и AKDGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO: 25) в качестве третьей CDR («CDR3») SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SYAMS (SEQ ID NO: 47) в качестве CDR1, AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 24) в качестве CDR2 и DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO: 70) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 5.

[11] Другой аспект настоящего изобретения относится к варибельному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:7, ADI-27749). В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 29) в качестве первой

определяющей комплементарность области («CDR1»), SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 30) в качестве второй CDR («CDR2») и ARGAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 31) в качестве третьей CDR («CDR3») SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SYSMN (SEQ ID NO: 48) в качестве CDR1, SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 30) в качестве CDR2 и GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 71) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 7.

[12] Другой аспект настоящего изобретения относится к переменному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:85, A49MI). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 29) в качестве CDR1, SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 30) в качестве CDR2 и ARGAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 77) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SYSMN (SEQ ID NO: 48) в качестве CDR1, SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 30) в качестве CDR2 и GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 78) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 85.

[13] Другой аспект настоящего изобретения относится к переменному домену тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичному аминокислотной последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAGFAYGMDYIYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:9, ADI-29378). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности YTFSTSYMH (SEQ ID NO: 35) в качестве первой определяющей комплементарность области («CDR1»), IINPSGGSTSYAQKFKG (SEQ ID NO: 36) в качестве второй CDR («CDR2») и AREGAGFAYGMDYIYMDV (SEQ ID NO: 37) в качестве третьей CDR («CDR3») SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SYMH (SEQ ID NO: 45) в качестве CDR1, IINPSGGSTSYAQKFKG (SEQ ID NO: 36) в качестве CDR2 и EGAGFAYGMDYIYMDV (SEQ ID NO: 72) в качестве CDR3 SEQ ID NO: 9.

[14] Переменный домен тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению может необязательно сочетаться с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнирные, CH2- и CH3-домены с или без CH1-домена. В некоторых вариантах

осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела человека, такой как константная область IgG1 человека, константная область IgG2 человека, константная область IgG3 человека или константная область IgG4 человека. 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. Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью IgG1 человека, 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. Типовые замены 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.

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

[16] В некоторых вариантах осуществления один из переменных доменов тяжелой цепи, описанных в настоящем документе, комбинируют с переменным доменом легкой цепи с образованием антигенсвязывающего участка, способного связывать NKG2D. Например, переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 может быть спарен с переменным доменом легкой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичным аминокислотной последовательности EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2, ADI-29379). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:14) в качестве первой определяющей комплементарности области («CDR»), GASTRAT (SEQ ID NO:15) в качестве второй CDR и QQYDDWPFIT (SEQ ID NO:16) в качестве третьей CDR.

[17] Например, переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 может быть спарен с переменным доменом легкой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичным аминокислотной последовательности

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPAR
 FSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4, ADI-
 29463). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела
 по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления
 переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности
 RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:20) в качестве первой определяющей комплементарности
 области («CDR»), GASTRAT (SEQ ID NO:21) в качестве второй CDR и QQDDYWPPT (SEQ
 ID NO:22) в качестве третьей CDR.

[18] Например, переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на
 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 может быть спарен с
 переменным доменом легкой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичным
 аминокислотной последовательности
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6, ADI-
 27744). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела
 по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления
 переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности
 RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:26) в качестве первой определяющей комплементарности
 области («CDR»), AASSLQS (SEQ ID NO:27) в качестве второй CDR и QQGVSYPRT (SEQ
 ID NO:28) в качестве третьей CDR.

[19] Например, переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на
 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или 85 может быть
 спарен с переменным доменом легкой цепи антитела по меньшей мере на 90%
 идентичным аминокислотной последовательности
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8, ADI-
 27749). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела
 по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления
 переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности
 RASQGISSWLA (SEQ ID NO:32) в качестве первой определяющей комплементарности
 области («CDR»), AASSLQS (SEQ ID NO:33) в качестве второй CDR и QQGVSPRPT (SEQ
 ID NO:34) в качестве третьей CDR.

[20] Например, переменный домен тяжелой цепи антитела по меньшей мере на
 90% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 может быть спарен с
 переменным доменом легкой цепи антитела по меньшей мере на 90% идентичным
 аминокислотной последовательности
 EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPA
 RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVYYCQQSDNWPPTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10,
 ADI-29378). В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи
 антитела по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах

осуществления переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:38) в качестве первой определяющей комплементарности области («CDR»), DASNRAI (SEQ ID NO:39) в качестве второй CDR и QQSDNWPFT (SEQ ID NO:40) в качестве третьей CDR.

[21] Когда переменный домен тяжелой цепи объединяют с переменным доменом легкой цепи с образованием антигенсвязывающего участка, способного связывать NKG2D, антигенсвязывающий участок может быть включен в различные структуры, например, в типичную структуру антитела с двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными легкими цепями, образующими пару антигенсвязывающих участков, способных связывать NKG2D; биспецифическое, триспецифическое, тетраспецифическое или другое мультиспецифическое антитело; или меньшую структуру, такую как scFv (в которой переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи).

[22] В некоторых вариантах осуществления любой участок, связывающий антиген NKG2D, раскрытый в настоящем изобретении, включен в белок, который также включает отдельный антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном, который может позволить белку одновременно взаимодействовать с NK-клеткой и опухолевой клеткой. Опухоль-ассоциированный антиген, например, может представлять собой CD33, HER2, EpCAM, CD2, CD3, CD8, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD37, CD38, CD40, CD45RO, CD48, CD52, CD55, CD59, CD70, CD74, CD80, CD86, CD138, CD147, HLA-DR, CSAp, CA-125, TAG-72, EFGR/ERBB1, IGF1R, HER2, HER3, HER4, IGF-1R, c-Met, PDGFR, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, TNFR1, TNFR2, NGFR, TRAILR1, TRAILR2, Fas (CD95), DR3, DR4, DR5, DR6, VEGF, PlGF, тенацин, ED-B фибронектин, PSA и IL-6, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 или PD1.

[23] В некоторых вариантах осуществления любой участок, связывающий NKG2D, раскрытый в настоящем изобретении, включен в белок, который также содержит участок опухоль-ассоциированного антигена и участок связывания с CD16. Участок связывания с CD16 может представлять собой дополнительный антигенсвязывающий участок или константную область антитела или ее часть, такую как константная область IgG1 (которая может необязательно включать одну или более мутаций, влияющих, например, на эффекторную активность или аффинность связывания с CD16).

[24] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ усиления гибели опухолевых клеток и лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе белка для лечения рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[25] На Фиг. 1 представлен мультиспецифический связывающий белок, содержащий NKG2D-связывающий домен (правое плечо), опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (левое плечо) и Fc-домен или его часть, которая связывается с CD16.

[26] На Фиг. 2 представлен мультиспецифический связывающий белок, содержащий NKG2D-связывающий домен, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен, любой из которых может быть в формате scFv, и Fc-домен или его часть, которая связывается с CD16.

[27] На Фиг. 3A-3F представлены профили аффинности связывания с NKG2D NKG2D-связывающих доменов, измеренные с помощью поверхностного плазмонного резонанса. На Фиг. 3A представлена аффинность связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-27744, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса; на Фиг. 3B представлена аффинность связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-29379, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса; на Фиг. 3C представлена аффинность связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-27749, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса; на Фиг. 3D представлена аффинность связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-29463, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса; на Фиг. 3E представлена аффинность связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-29378, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[28] На Фиг. 4A-H представлены профили конкурентного связывания с NKG2D NKG2D-связывающего домена ADI-27744 (A44) и ULBP6, или других антител к NKG2D, измеренные с помощью поверхностного плазмонного резонанса. На Фиг. 4A продемонстрирован профиль моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744, инъецированный поверх иммобилизованного NKG2D с последующей инъекцией ULBP6. На Фиг. 4B продемонстрирован профиль ULBP6, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744. На Фиг. 4C продемонстрирован профиль моноклонального антитела к MS, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией ULBP6. На Фиг. 4D продемонстрирован профиль MS, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744. На Фиг. 4E продемонстрирован профиль 1D11, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744. На Фиг. 4F продемонстрирован профиль MAB139, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744. На Фиг. 4G продемонстрирован профиль моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27749 (A49); и на Фиг. 4H продемонстрирован профиль моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744, инъецированного поверх иммобилизованного NKG2D, с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего F47.

[29] На Фиг. 5 представлены линейные графики, показывающие профиль связывания нацеленных на CD33 TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на поверхности клеток EL4.

[30] На Фиг. 6 представлены линейные графики, показывающие профиль связывания нацеленных на HER2 TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на поверхности клеток EL4.

[31] На Фиг. 7 представлены гистограммы, показывающие профиль связывания нацеленных на CD33 TriNKET с CD33, экспрессируемым на поверхности клеток Mv4-11.

[32] На Фиг. 8 представлены гистограммы, показывающие профиль связывания нацеленных на HER2 TriNKET с HER2, экспрессируемым на поверхности клеток 786-O.

[33] На Фиг. 9 представлены гистограммы, показывающие профиль связывания нацеленных на HER2 TriNKET с HER2, экспрессируемым на поверхности клеток NCI-H661.

[34] На Фиг. 10 представлены гистограммы, показывающие, что TriNKET, нацеленные на HER2, опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивируемых с HER2-экспрессирующими клетками NCI-H661.

[35] На Фиг. 11 представлены гистограммы, показывающие, что TriNKET, нацеленные на HER2, опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивируемых с HER2-экспрессирующими клетками SkBr-3.

[36] На Фиг. 12 представлены гистограммы, показывающие, что TriNKET, нацеленные на CD33, опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивируемых с CD33-экспрессирующими клетками ОМЛ Mv4-11 человека.

[37] На Фиг. 13 представлены линейные графики, показывающие, что TriNKET, нацеленные на CD33, обеспечивают цитотоксичность покоящихся NK-клеток в отношении CD33-экспрессирующих раковых клеток Molm-13.

[38] На Фиг. 14 представлены линейные графики, показывающие, что TriNKET, нацеленные на CD33, обеспечивают цитотоксичность активированных NK-клеток в отношении CD33-экспрессирующих раковых клеток Molm-13.

[39] На Фиг. 15 представлены гистограммы, показывающие, что TriNKET, нацеленные на HER2, обеспечивают цитотоксичность покоящихся NK-клеток в отношении HER2-экспрессирующих раковых клеток 786-O.

[40] На Фиг. 16 представлены гистограммы, показывающие, что TriNKET, нацеленные на HER2, обеспечивают цитотоксичность активированных NK-клеток в отношении HER2-экспрессирующих раковых клеток 786-O.

[41] На Фиг. 17 представлен TriNKET в форме триомаба, который представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, которое поддерживает IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител, каждое с одной легкой и одной тяжелой цепью, которые происходят от двух родительских антител. Форма триомаба представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую $\frac{1}{2}$ антитела крысы и $\frac{1}{2}$ антитела мыши.

[42] На Фиг. 18 представлен TriNKET в форме общей легкой цепи (LC), в которой используется технология «выступы-во-впадины» (КИН). КиН представляет собой

гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. TriNKET в формате KiH может быть гетеродимерной конструкцией с 2 fab, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащей 2 разных тяжелых цепи и общую легкую цепь, которая спаривается с обоими HC.

[43] На Фиг. 19 представлен TriNKET в форме иммуноглобулина с двумя переменными доменами (DVD-IgTM), который объединяет домены связывания мишеней двух моноклональных антител через гибкие природные линкеры и приводит к четырехвалентной IgG-подобной молекуле. DVD-IgTM представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой антиген 2, нацеленный на переменный домен, слит с N-концом переменного домена антигена 1, нацеленного на Fab. Конструкция содержит нормальный Fc.

[44] На Фиг. 20 представлен TriNKET в форме ортогональной поверхности Fab (Ortho-Fab), который представляет собой гетеродимерную конструкцию, которая содержит 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Спаривание LC-HC обеспечивается ортогональной поверхностью. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[45] На Фиг. 21 представлен TriNKET в формате Ig 2-в-1.

[46] На Фиг. 22 представлен TriNKET в формате ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатической мутацией в Fc.

[47] На Фиг. 23 представлен TriNKET в форме обмена Fab-фрагментами: антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекулы) на пару тяжелых-легких цепей из другой молекулы, что приводит к биспецифическим антителам. Форма обмена Fab-фрагментами (сFae) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации.

[48] На Фиг. 24 представлен TriNKET в форме тела SEED, который представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированные мутациями гетеродимеризации.

[49] На Фиг. 25 представлен TriNKET в форме LuZ-Y, в которой лейциновая «молния» используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC. Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий 2 различных scFab, связывающихся с мишенью 1 и 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается с помощью мотивов лейциновой «молнии», слитых с C-концом Fc.

[50] На Фиг. 26 представлен TriNKET в форме Cov-X-тела.

[51] На Фиг. 27A-27B представлен TriNKET в формах κλ-тела, которые представляют собой гетеродимерные конструкции с 2 различными Fab, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: Fab1-нацеливающий антиген 1 содержит каппа-LC, тогда как второй Fab-нацеливающий антиген 2 содержит лямбда LC.

На Фиг. 27А представлено типовое представление одной формы κλ-тела. На Фиг. 27В представлено типовое представление другого κλ-тела.

[52] На Фиг. 28 представлена гетеродимерная конструкция Oasc-Fab, которая включает связывание Fab с мишенью 1 и связывание scFab с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[53] На Фиг. 29 представлена DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab, связывающихся с антигеном 1 и 2, и Fc стабилизированные мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат дифференциальные S-S мостики, которые обеспечивают правильное сопряжение LC и HC.

[54] На Фиг. 30 представлена CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с 2 различными Fab, связывающимися с мишенью 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированными гетеродимеризацией. CL- и CH1-домены и VH- и VL-домены поменяны местами, *например*, CH1 соединен с VL, в то время как CL соединен с VH.

[55] На Фиг. 31 представлена Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерные конструкции, где связывание Fab с антигеном 2, слитым с N-концом HC Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

[56] На Фиг. 32 представлена серия линейных графиков, демонстрирующих связывание TriNKET A* и TriNKET A с NKG2D человека в соответствии с SPR. Верхние панели представляют кинетическую посадку, а нижние панели соответствуют установившейся аффинности.

[57] На Фиг. 33 представлен линейный график, демонстрирующий эффективность TriNKET A и TriNKET A* в опосредовании цитотоксичности НК-клеток в отношении клеток-мишеней.

[58] На Фиг. 34 представлен линейный график, демонстрирующий эффективность TriNKET A и TriNKET A* в опосредовании цитотоксичности НК-клеток в отношении клеток-мишеней.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[59] В настоящем изобретении предлагаются переменные домены тяжелой цепи антитела, которые могут быть спарены с переменными доменами легкой цепи антитела с образованием антигенсвязывающего участка, нацеленного на рецептор NKG2D на естественных клетках-киллерах, белки, которые включают участки, связывающие антиген NKG2D, фармацевтические композиции, содержащие такие белки, и терапевтические способы с использованием таких белков и фармацевтических композиций для лечения рака. Различные аспекты настоящего изобретения изложены ниже в разделах; однако аспекты настоящего изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны быть ограничены каким-либо конкретным разделом.

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

[61] Термины в единственном числе, используемые в данном документе, означают «один или более» и включают множественное число, если это не противоречит контексту.

[62] Термины «субъект» и «пациент», в контексте настоящего изобретения, относятся к организму, подлежащему лечению с помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих (*например*, мышей, обезьян, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек и тому подобное) и более предпочтительно включают людей.

[63] Термин «антигенсвязывающий участок», в контексте данного документа, относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В антителах человека антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых переменных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно расходящихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей называются «гиперпеременными 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 и рядом гиперпеременных областей в иммуноглобулинах. В молекуле антитела человека три гиперпеременные области легкой цепи и три гиперпеременные области тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гиперпеременные области каждой из тяжелых и легких цепей называются «определяющими комплементарность областями» или «CDR». У некоторых животных, таких как верблюдовые и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий участок образован одноцепочечным антителом, образующим «однодоменное антитело». Антигенсвязывающие участки могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, которое сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, с использованием пептидного линкера для соединения переменного домена тяжелой цепи с переменным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

[64] Термин «эффективное количество», в контексте настоящего изобретения, относится к количеству соединения (*например*, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений, применений или дозировок, и не предназначено для ограничения конкретным составом или путем введения. Термин «лечение», в контексте настоящего изобретения, включает любой эффект, *например*, ослабление, уменьшение, модулирование, улучшение или устранение, которое приводит к улучшению патологического состояния, заболевания, расстройства и т.п., или ослабление его симптома.

[65] Термин «фармацевтическая композиция», в контексте настоящего изобретения, относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

[66] Термин «фармацевтически приемлемый носитель», в контексте настоящего изобретения, относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (*например*, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Например, носители, стабилизаторы и адъюванты, см. *например*, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[67] Во всем описании, где композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии, предполагается, что, кроме того, существуют композиции по настоящему изобретению, которые состоят в основном из перечисленных компонентов или состоят из них, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим изобретением, которые состоят по существу или состоят из перечисленных стадий обработки.

[68] Как правило, композиции, в которых указан процент, процент представляет собой массовый процент, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то учитывают предыдущее определение переменной.

Участок, связывающий антиген NKG2D

[69] В настоящем изобретении предлагаются антигенсвязывающие участки, связывающие NKG2D, и переменные домены тяжелой цепи антигена, которые можно использовать для создания таких антигенсвязывающих участков.

[70] Переменные домены тяжелой цепи антитела и переменные домены легкой цепи, которые они спаривают для образования антигенсвязывающих участков, способных связывать и агонизировать рецептор NKG2D, теперь идентифицированы и представлены в Таблице 1 ниже. Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в Таблице 1, определяют по Кабат.

Таблица 1		
Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASG YTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGII NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSED TAVYYCARGAPNYG	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSEDF A

	<p>DTTHDYYYMDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:11) - YTFTSYMH или CDR1 (SEQ ID NO:45) - SYMH</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:12) - IINPSGGSTSYAQKFQG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:13) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV или CDR3 (SEQ ID NO:68) - GAPNYGDTTHDYYYMDV</p>	<p>VYYCQQYDDWPFTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:2)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:14) - RASQSVSSNLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:15) - GASTRAT</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:16) - QQYDDWPFT</p>
ADI-29463 (F63)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGW INPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELSLRSDDTAVYYCARDTGEY YDTHDHGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:17) - YTFTGYMH или CDR1 (SEQ ID NO:46) - GYMH</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:18) - WINPNSGGTNYAQKFQG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:19) - ARDTGEYYDTHDHGMDV или CDR3 (SEQ ID NO:69) - DTGEYYDTHDHGMDV</p>	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YVCQQDDYWPPTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:20) - RASQSVSSNLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:21) - GASTRAT</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:22) - QQDDYWPPT</p>
ADI-27744 (A44)	<p>EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYYDS GAGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:23) - FTFSSYAMS или CDR1 (SEQ ID NO:47) - SYAMS</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTI TCRASQGIDSWLAWYQQK GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGVSYPRTFGGGK VEIK (SEQ ID NO:6)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:26) - RASQGIDSWLA</p>

	<p>CDR2 (SEQ ID NO:24) - AISGSGGSTYYADSVKG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:25) - AKDGGYYDSGAGDY или CDR3 (SEQ ID NO:70) - DGGYYDSGAGDY</p>	<p>CDR2 (SEQ ID NO:27) - AASSLQS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:28) - QQGVSYPRT</p>
ADI-27749 (A49)	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAA GWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:7)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSSYIYYADSVKG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:31) - ARGAPMGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:71) - GAPMGAAAGWFDP</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSFPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSFPRT</p>
ADI-29378 (E78)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGII NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMESSLRSEDVAVYYCAREGAGFA YGMDYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:9)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:35) - YTFTSYMH или CDR1 (SEQ ID NO:45) - SYMH</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:36) - IINPSGGSTSYAQKFQG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:37) - AREGAGFAYGMDYYYMDV или CDR3 (SEQ ID NO:72) - EGAGFAYGMDYYYMDV</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSDNWPFTFGGGTKVE IK (SEQ ID NO:10)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:38) - RASQSVSSYLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:39) - DASN RAT</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:40) - QQSDNWPFT</p>
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI

	<p>TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>Q</u>GAAA GWFDPPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:83) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:73) - ARGAP<u>Q</u>GAAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:74) - GAP<u>Q</u>GAAAAGWFDP</p>	<p>TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT</p>
A49ML	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>L</u>GAAA GWFDPPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:84) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:75) - ARGAP<u>L</u>GAAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:76) - GAP<u>L</u>GAAAAGWFDP</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT</p>
A49MI	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>I</u>GAAA GWFDPPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) -</p>

	<p>- SYSMN</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:77) - ARGAP<u>I</u>GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:78) - GAP<u>I</u>GAAAGWFDP</p>	<p>RASQGISSWLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT</p>
A49MF	<p>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^CAASGF TFSSYSMNWVRQAPGK^GLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDN^AKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>F</u>GAAA GWFD^PWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:86)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:79) - ARGAP<u>F</u>GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:80) - GAP<u>F</u>GAAAGWFDP</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGD^RVTI TCRASQGISSWLA^WYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT</p>
A49MV	<p>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^CAASGF TFSSYSMNWVRQAPGK^GLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDN^AKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>V</u>GAAA GWFD^PWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:41)</p> <p>CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG</p> <p>CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:81) - ARGAP<u>V</u>GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:82) - GAP<u>V</u>GAAAGWFDP</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGD^RVTI TCRASQGISSWLA^WYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA</p> <p>CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS</p> <p>CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT</p>
A49-	<p>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^CAASGF</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGD^RVTI</p>

консенсуш ая	<p>TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>X</u>GAAA GWFDPWGQGLVTVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:42) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:43) - ARGAP<u>X</u>GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:44) - GAP<u>X</u>GAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F</p>	<p>TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGVSFPRTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSFPRT</p>
-----------------	--	---

[71] Одно из преимуществ одной или более аминокислотных последовательностей переменного домена тяжелой цепи антитела, описанных выше, заключается в том, что они могут связываться с NKG2D человека и яванского макака для агонизации рецептора и конкурировать с природными лигандами за связывание с рецептором. Дополнительные антигенсвязывающие участки, которые связывают NKG2D и обладают одним или более из этих свойств, также особенно полезны и могут быть идентифицированы с помощью анализов конкуренции связывания, известных в данной области техники. Например, дополнительные антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы путем конкуренции с ADI-29379, ADI-29463, ADI-27744, ADI-27749 или ADI-29378 для связывания как с NKG2D человека, так и необязательно с NKG2D яванского макака.

[72] Другое преимущество NKG2D-связывающих участков, которые содержат переменные домены тяжелой цепи антитела и последовательности переменных доменов легкой цепи, описанные выше, заключается в том, что они могут связываться с NKG2D с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие участки связываются с NKG2D с K_D от 0,1 до 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие участки связываются с NKG2D с K_D от 1 до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие участки связываются с NKG2D с K_D от 5 до 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления NKG2D-связывающие участки связываются с NKG2D с K_D от 10 до 62 нМ.

[73] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему переменный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 91, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13 или 68. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16.

[74] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 92, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO: 21, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22.

[75] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 93, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

[76] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 71. В некоторых

вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[77] Аминокислотный остаток M в положении 102 SEQ ID NO: 7, который находится в CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи, может быть мутирован. В некоторых вариантах осуществления M102 замещен незаряженным остатком. В некоторых вариантах осуществления M102 замещен гидрофобным остатком (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp). В некоторых вариантах осуществления M102 замещен полярным остатком (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln или Tyr). В некоторых вариантах осуществления M102 замещен Leu, Ile, Val, Gln или Phe.

[78] Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[79] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела,

который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[80] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1,

представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[81] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему варибельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, и варибельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий варибельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79 или 80. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий варибельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[82] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему участку, содержащему варибельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и варибельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит варибельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 30, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO:82. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[83] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 91, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40.

[84] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%

(например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 6, который не блокирует связывание антител к NKG2D MS, 1D11 и MAB139 с NKG2D.

[85] В вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, 83, 84, 85, 86 или 87, и переменный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 8, не блокирует связывание антигенсвязывающего участка, включающего переменный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и переменный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 6, с NKG2D.

[86] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 6, связываются с уникальным эпитопом на NKG2D, в отличие от MS, 1D11, MAB139, ADI-27749 и F47-связывающего эпитопа(ов).

Антитела и мультиспецифические связывающие белки

[87] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения участки, связывающие антиген NKG2D, образованные путем спаривания переменного домена тяжелой цепи антитела с переменным доменом легкой цепи, описанного в настоящем документе, могут быть включены в более крупные белки, такие как интактные антитела, мультиспецифические связывающие белки или мультиспецифические связывающие антитела. Например, NKG2D-связывающийся участок может быть объединен со вторым компонентом, например, вторым антигенсвязывающим участком. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий участок связывается с одним или более опухоль-ассоциированными антигенами, такими как CD33, HER2, EpCAM, CD2, CD3, CD8, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD45RO, CD48, CD52, CD55, CD59, CD70, CD74, CD80, CD86, CD138, CD147, HLA-DR, CSAP, CA-125, TAG-72, EFGR/ERBB1, IGF1R, HER3, HER4, IGF-1R, c-Met, PDGFR, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, TNFR1, TNFR2, NGFR, TRAILR1, TRAILR2, Fas (CD95), DR3, DR4, DR5, DR6, VEGF, PIGF, тенасцин, ED-B фибронектин, PSA и IL-6, MAGE-A3, B7.1, B7.2,

CTLA4 или PD1. Связывание мультиспецифического связывающего белка с NKG2D и с опухоль-ассоциированным антигеном на раковой клетке приводит к тому, что раковая клетка приближается к естественной клетке-киллеру, что облегчает прямое и опосредованное разрушение раковой клетки естественной клеткой-киллером.

[88] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к NKG2D-связывающему участку и опухоль-ассоциированному антигенсвязывающему участку, мультиспецифический связывающий белок может дополнительно включать домен, который связывается с CD16, Fc-рецептором на поверхности лейкоцитов, включая естественные клетки-киллеры макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления CD16-связывающий домен может включать Fc-область антитела или его часть. В некоторых вариантах осуществления домен, который связывается с CD16, содержит шарнирные домены, CH2- и CH3-домены Fc-области антитела с или без CH1-домена. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела происходит из Fc-областей иммуноглобулинов человека и/или других млекопитающих. Известно, что в Fc-области связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и CH2-доменом. Например, в IgG1 человека взаимодействие с CD16 опосредуется через аминокислотные остатки Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в CH2-домене (см., Sondermann *et al*, Nature, 406(6793):267-273). На основании известных доменов и аминокислотных остатков в некоторых вариантах осуществления мутации могут быть выбраны в пределах CD16-связывающего домена для усиления или уменьшения его аффинности связывания с CD16. Способы отбора являются хорошо известными в данной области техники, такие как библиотеки фагового дисплея или кДНК библиотеки поверхностного дисплея дрожжей. Подходящие способы отбора также могут быть сконструированы специалистом в данной области техники на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

[89] Описанные в данном документе мультиспецифические связывающие белки могут принимать различные форматы. Например, один формат представляет собой гетеродимерное мультиспецифическое антитело, которое включает первую тяжелую цепь иммуноглобулина, первую легкую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и вторую легкую цепь иммуноглобулина. Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc (шарнирный-CH2-CH3) домен, первый переменный домен тяжелой цепи и необязательно первый домен тяжелой цепи CH1. Первая легкая цепь иммуноглобулина включает первый переменный домен легкой цепи и первый константный домен легкой цепи. Первая легкая цепь иммуноглобулина вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина образует антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc (шарнирный-CH2-CH3) домен, второй переменный домен тяжелой цепи и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1. Вторая легкая цепь иммуноглобулина включает второй переменный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи. Вторая легкая

цепь иммуноглобулина вместе со второй тяжелой цепью иммуноглобулина образует антигенсвязывающий участок, который связывает опухолевый антиген. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (Фиг. 1).

[90] Другой типовой формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, которое включает первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина. Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc (шарнирный-CH2-CH3) домен, слитый либо с помощью линкера, либо шарнирной области антитела с одноцепочечным переменным фрагментом (scFv), состоящим из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, который спаривается и связывается с NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает Fc (шарнирный-CH2-CH3) домен, второй переменный домен тяжелой цепи и необязательно домен тяжелой цепи CH1. Легкая цепь иммуноглобулина включает переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина соединяется с легкой цепью иммуноглобулина и связывается с опухоль-ассоциированным антигеном. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (Фиг. 2). Дополнительные форматы мультиспецифических связывающих белков могут быть разработаны путем объединения различных форматов NKG2D-связывающих фрагментов, описанных в данном документе.

[91] Один или более дополнительных мотивов связывания могут быть слиты с C-концом CH3-домена константной области, необязательно через линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок может представлять собой одноцепочечный или стабилизированный дисульфидными связями переменный участок (scFv) или может образовывать четырехвалентную или трехвалентную молекулу.

[92] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме триомаба, который представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, которое поддерживает IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител, каждое с одной легкой и одной тяжелой цепью, которые происходят от двух родительских антител. Форма триомаба представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую $\frac{1}{2}$ антитела крысы и $\frac{1}{2}$ антитела мыши.

[93] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представляет собой форму общей легкой цепи (LC), в которой используется технология «выступы-во-впадины» (K1H). K1H включает конструирование CH3-доменов для создания «выступа» или «впадины» в каждой тяжелой цепи для содействия гетеродимеризации. Концепция технологии Fc «выступы-во-впадины (K1H)» заключалась в том, чтобы ввести «выступ» в одном CH3-домене (CH3A) путем замены небольшого остатка на объемный (то есть, T366W_{CH3A} в нумерации ЕС). Чтобы приспособить «выступ», на другом CH3-домене (CH3B) был создан дополнительный «выступ» поверхности путем замены ближайших соседних остатков к выступу более мелкими (т.е., T366S/L368A/Y407V_{CH3B}). Мутация по типу «выступ» была оптимизирована путем

скрининга структурно-направленной фаговой библиотеки (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* (1997) 270(1):26-35). Рентгеновские кристаллические структуры KiH Fc вариантов (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 FcγR3s. *Mol Immunol* (2014) 58(1): 132-8) продемонстрировали, что гетеродимеризация термодинамически поддерживается гидрофобными взаимодействиями, обусловленными стерической комплементарностью на границе между ядром CH3-домена и внутренней поверхностью, тогда как поверхности впадина-впадина и выступ-выступ не благоприятствуют гомодимеризации вследствие стерического затруднения и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

[94] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме иммуноглобулина с двумя переменными доменами (DVD-IgTM), которые объединяют домены связывания мишеней двух моноклональных антител через гибкие природные линкеры и дает четырехвалентную IgG-подобную молекулу. DVD-IgTM представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой антиген 2, нацеленный на переменный домен, слит с N-концом переменного домена антигена 1, нацеленного на Fab. Конструкция содержит нормальный Fc.

[95] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме ортогональной поверхности Fab (Ortho-Fab), которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Спаривание LC-НС обеспечивается ортогональной поверхностью. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc. В подходе к орто-Fab IgG (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, *et al.* Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2):191-8), региональный дизайн на основе структуры вводит комплементарные мутации в поверхность LC и НС_{VH-CH1} только в одном Fab, без каких-либо изменений в другом Fab.

[96] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в формате 2-в-1 Ig. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатической мутацией в Fc.

[97] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме κλ-тела, которая представляет собой гетеродимерные конструкции с 2 различными Fab, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: Fab1-нацеливающий антиген 1 содержит каппа-LC, тогда как второй Fab-нацеливающий антиген 2 содержит лямбда LC.

[98] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме обмена Fab-фрагментами (антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекулы) на пару тяжелых-легких цепей из другой молекулы, что приводит к биспецифическим антителам). Форма обмена Fab-фрагментами (сFae) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации.

[99] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме тела SEED, которое представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированные мутациями гетеродимеризации. Домен, сконструированный путем обмена между цепями (SEED), был разработан для генерирования асимметричных и биспецифических антителоподобных молекул, что позволяет расширять терапевтические применения естественных антител. Данная платформа, полученная с помощью белковой инженерии, основана на обмене структурно родственных последовательностей иммуноглобулина в консервативных CH3-доменах. Конструкция SEED позволяет эффективно генерировать гетеродимеры AG/GA, в то же время препятствуя гомодимеризации доменов AG и GA SEED CH3. (Muda M. et al., *Protein Eng. Des. Sel.* (2011), 24(5):447-54)).

[100] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме LuZ-Y, в которой лейциновая «молния» используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC. (Wranik, BJ. et al., *J. Biol. Chem.* (2012), 287:43331-9). Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий 2 различных scFab, связывающихся с мишенью 1 и 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается с помощью мотивов лейциновой «молнии», слитых с C-концом Fc.

[101] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Cov-X-Body (В биспецифических CovX-антител два разных пептида соединяются вместе с использованием разветвленного азетидинового линкера и сливаются с каркасным антителом в мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры отвечают за функциональную активность, каркас антител обеспечивает длительный период полураспада 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).

[102] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в гетеродимерном формате Oasc-Fab, который включает связывание Fab с мишенью 1 и связывание scFab с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

[103] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в формате DuetMab, содержащем 2 разных Fab, связывающихся с

антигеном 1 и 2, и Fc стабилизированные мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат дифференциальные S-S мостики, которые обеспечивают правильное сопряжение LC и HC.

[104] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в формате CrossmAb, который представляет собой гетеродимерную конструкцию с 2 различными Fab, связывающими с мишенью 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированными гетеродимеризацией. CL- и CH1-домены и VH- и VL-домены поменяны местами, например, CH1 соединен с VL, в то время как CL соединен с VH.

[105] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в формате CrossmAb, который представляет собой гомодимерные конструкции, где связывание Fab с антигеном 2 слитом с N-концом HC Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

Тяжелые цепи гетеродимерных антител

[106] Сборка тяжелых цепей гетеродимерных антител может быть осуществлена путем экспрессии двух разных последовательностей тяжелых цепей антител в одной и той же клетке, что может привести к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также сборке гетеродимеров. Преимущественная сборка гетеродимерных тяжелых цепей в описанных в данном документе мультиспецифических связывающих белках может быть достигнута путем включения различных пар аминокислотных замен в первый CH3-домен в первом полипептиде тяжелой цепи и во второй CH3-домен во втором полипептиде тяжелой цепи, что позволяет этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480, US14/830336. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические связывающие белки содержат Fc-домен IgG1 человека. Ниже приведены различные примеры аминокислотных замен в паре Fc-доменов IgG1 человека для облегчения гетеродимеризации двух тяжелых цепей. Каждое положение аминокислотных замен пронумеровано в соответствии с индексом EU, как в Кабат.

[107] В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде заменяет исходную аминокислоту более крупной аминокислотой, выбранной из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W) и по меньшей мере одной аминокислоты кислотное замещение во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту (аминокислоты) меньшей аминокислотой(ами), выбранной из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), так что чем больше аминокислотная замена (выступ) вписывается в поверхность более мелких аминокислотных замен (полость). Например, один полипептид может включать замену T366W, а другой может включать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

[108] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в Таблице 2.

Таблица 2		
	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

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

Таблица 3		
	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

[110] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, приведенных в Таблице 4.

Таблица 4		
	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

[111] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из Таблицы 5.

Таблица 5	
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

[112] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в Таблице 6, где аминокислота в положении(ях), указанном в столбце «Первый полипептид», заменена любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, и аминокислота в положении(ях), указанном в столбце «Второй полипептид», заменена любой известной положительно заряженной аминокислотой.

Таблица 6	
Первый полипептид	Второй полипептид
K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

[113] Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в Таблице 7, где аминокислота в положении(ях), указанном в столбце «Первый полипептид», заменена любой известной положительно заряженной аминокислотой, и аминокислота в указанном положении(ях) в столбце «Второй полипептид», заменена любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

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

[114] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, приведенных в Таблице 8.

Таблица 8	
Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A и Y407V	T350V, T366L, K392L и T394W

[115] Альтернативно или в дополнение, структурная стабильность гетеродимерных тяжелых цепей в мультиспецифических связывающих белках может быть повышена путем введения S354C на первой или второй полипептидной цепи и Y349C на противоположной

полипептидной цепи, которая образует искусственный дисульфидный мостик на границе раздела двух полипептидов.

[116] Мультиспецифические связывающие 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 тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в третий вектор экспрессии; четвертая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в четвертый вектор экспрессии; при этом первый, второй, третий и четвертый векторы экспрессии могут стабильно трансфицироваться вместе в клетки-хозяева для продуцирования мультимерных белков.

[117] Для достижения наибольшего выхода мультиспецифических связывающих белков можно изучить различные соотношения первого, второго, третьего и четвертого векторов экспрессии для определения оптимального соотношения для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для генерации банка клеток с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ограниченное разведение, ИФА, FACS, микроскопия или Clonепix.

[118] Клоны могут быть культивированы в условиях, подходящих для масштабирования в биореакторе и поддержания экспрессии мультиспецифического белка. Мультиспецифические связывающие белки могут быть выделены и очищены с использованием способов, известных в данной области техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, обменную хроматографию гидрофобного взаимодействия и хроматографию со смешанным режимом.

Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует с NKG2D-связывающими сайтами, описанными в данном документе.

[119] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается белок, включающий антигенсвязывающий участок, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, описанными в данном документе, за связывание с NKG2D. Описанные в данном документе NKG2D-связывающие участки содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и 6; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 10; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 83 и 8; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84 и 8; аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 85 и 8; аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86 и 8; или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 87 и 8. Данные NKG2D-связывающие участки могут связываться с различными эпитопами на NKG2D, картированными поверхностным плазмонным резонансом. Например, в отличие от ADI-27749 и других существующих антител к NKG2D ADI-27744 связывается с другим эпитопом на NKG2D, как продемонстрировано в Примере 2.

[120] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок белка, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок белка, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3, и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок белка, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок белка, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок белка, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, включает переменный домен тяжелой цепи,

имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и варибельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50% (*например*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10.

[121] В некоторых вариантах осуществления белок, включающий антигенсвязывающий участок, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, описанными в данном документе, дополнительно включает второй антигенсвязывающий участок, который связывает опухоль-ассоциированный антиген и/или участок связывания с CD16. В некоторых вариантах осуществления участок связывания с CD16 представляет собой константную область антитела или ее часть, способную связывать CD16. В некоторых вариантах осуществления участок связывания с CD16 содержит Fc-домен IgG1 человека.

Клетка для экспрессии белка

[122] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих белок, который содержит: NKG2D-связывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; NKG2D-связывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; NKG2D-связывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; NKG2D-связывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, 83, 84, 85, 86 или 87 и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; или NKG2D-связывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

Терапевтические применения

[123] Изобретение относится к способам усиления гибели опухолевых клеток и/или лечения рака с использованием мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем изобретении, и/или фармацевтической композиции, описанной в изобретении. Способы могут быть использованы для лечения различных видов рака. Тип рака, подлежащего лечению, желательно соответствует типу раковой клетки, с которой связывается белок. Дополнительные аспекты и варианты осуществления терапевтических способов описаны ниже.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[124] В одном аспекте настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат эффективное количество белка, который содержит NKG2D-связывающий участок, описанный в настоящем описании, или NKG2D-связывающий участок, который конкурирует с NKG2D-связывающими участками, описанными в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

[125] В некоторых вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления состав содержит белок, который включает антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления состав содержит белок, который включает антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления состав содержит белок, который включает антигенсвязывающий участок с вариабельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, 83, 84, 85, 86 или 87, и вариабельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления состав содержит белок, который включает антигенсвязывающий участок с вариабельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и вариабельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[126] Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарственного средства. Одно или более физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей могут быть включены в состав для правильного составления. Подходящие составы для использования в настоящем раскрытии найдены в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарственных средств *см.*, например, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[127] Например, настоящее раскрытие может существовать в виде водного фармацевтического состава, включающего терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем композицию. Водные носители могут включать в себя стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH забуференный раствор (например, забуференный фосфатом солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В определенных вариантах осуществления готовят водный состав, включающую белок, раскрытый в настоящем документе, в pH забуференном растворе. 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. Диапазоны, промежуточные по отношению к указанным выше значениям pH, также должны быть частью этого раскрытия. Например, диапазоны значений, использующие комбинацию любого из приведенных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов, предназначены для включения. Примеры буферов, которые будут регулировать pH в этом диапазоне, включают ацетатные (*например*, ацетат натрия), сукцинатные (такие, как сукцинат натрия), глюконатные,

гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, фосфат динатрия дигидрат и/или дигидрофосфат натрия дигидрат. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает около 1,3 мг/мл лимонной кислоты (*например*, 1,305 мг/мл), около 0,3 мг/мл цитрата натрия (*например*, 0,305 мг/мл), около 1,5 мг/мл фосфата динатрий дигидрата (*например*, 1,53 мг/мл), около 0,9 мг/мл дигидрофосфата натрия дигидрата (*например*, 0,86) и около 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, от 0,25 до 0,5 мг/мл цитрата натрия, от 1,25 до 1,75 мг/мл фосфата динатрия дигидрата, от 0,7 до 1,1 мг/мл дигидрофосфата натрия дигидрата и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. рН жидкого состава может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой хлористоводородную кислоту. В определенных вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

[128] В некоторых вариантах осуществления состав включает водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и полезным для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), рН-буферный раствор (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[129] Полиол, который действует как тонизирующий агент и может стабилизировать антитело, также может быть включен в состав. Полиол добавляют к составу в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности состава. В определенных вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может быть изменено по отношению к молекулярной массе полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (*например*, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким, как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиол, который может быть использован в составе в качестве средства, регулирующего тоничность, представляет собой маннит. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от около 5 до около 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять около 7,5-15 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять около 10-14 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять около 12 мг/мл. В определенных вариантах осуществления полиол сорбит может быть включен в состав.

[130] Также могут быть добавлены в состав детергент или поверхностно-активное вещество. Типичные детергенты включают неионные детергенты, такие как полисорбаты (*например*, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полочсамеры (*например*, полочсамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно уменьшает агрегацию составленного

антитела и/или сводит к минимуму образование частиц в составе, и/или уменьшает адсорбцию. В определенных вариантах осуществления состав может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Твин 80. Твин 80 представляет собой термин, используемый для описания полиоксипропилен (20) сорбитанмоноолеата (см Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от около 0,1 до около 10 мг/мл полисорбата 80 или от около 0,5 до около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления около 0,1% полисорбата 80 может быть добавлено в состав.

[131] В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром при стабилизирующих уровнях. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен на водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем того, которое может привести к вязкости, нежелательной или непригодной для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления сахар может быть дисахаридами, *например*, сахарозой. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может также включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества и консерванта, который добавляют к составам по настоящему изобретению для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчать производство многофазного (многократного) состава.

[132] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к составу с увеличенным сроком хранения, включающей белок по настоящему изобретению, в сочетании с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, фосфатом динатрий дигидратом, дигидрофосфатом натрий дигидратом, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

[133] Дезамидирование представляет собой распространенный вариант пептидов и белков, который может происходить во время ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного средства и во время анализа образца. Дезамидирование представляет собой потерю NH_3 из белка, образующего промежуточный сукцинимид, который может подвергаться гидролизу. Промежуточное содержание сукцинимида приводит к снижению массы исходного пептида на 17 Да. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 ед. Выделение промежуточного сукцинимида затруднено из-за нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование обычно определяется как увеличение массы на 1 ед. 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, находящиеся вблизи с Asn в пептидной цепи, влияют на

скорости дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой восприимчивости к дезамидированию. В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть сохранен в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

[134] В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой лиофилизированный состав. В определенных вариантах осуществления состав является высушенным сублимацией (лиофилизированным) и содержится около в 12-60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления состав является лиофилизированным, и 45 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В определенных вариантах осуществления около 40 мг - около 100 мг лиофилизированного состава содержится в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в лекарственной форме для внутривенного введения. Состав может быть жидким составом. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав хранят в количестве от около 250 мг/флакон до около 1000 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления жидкий состав хранят в количестве около 600 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления жидкий состав хранят в количестве около 250 мг/флакон.

[135] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав включает белки, описанные в настоящем изобретении, и лиопротектор. Леопротектор может быть сахаром, *например*, дисахаридами. В определенных вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Леофилизированный состав может также включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества, наполнителя и/или консерванта. Количество сахарозы или мальтозы, пригодное для стабилизации лиофилизированного лекарственного средства, может быть в массовом соотношении по меньшей мере 1:2 белка к сахарозе или мальтозе. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белок/сахароза или мальтоза может составлять от 1:2 до 1:5.

[136] В некоторых вариантах осуществления pH состав перед лиофилизацией может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой хлористоводородную кислоту. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может быть гидроксид натрия. Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, может быть отрегулировано в диапазоне от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного средства может составлять от 7 до 8.

[137] В определенных вариантах осуществления может быть добавлен «наполнитель». «Наполнитель» представляет собой соединение, которое добавляет массу к лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (*например*, облегчает производство по существу однородной лиофилизированной

массы, которая поддерживает открытопористую структуру). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

[138] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт составлен в водном носителе. Представляющий интерес водный носитель в настоящем документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и полезным для приготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В определенных вариантах осуществления лиофилизированное лекарственное средство по настоящему изобретению восстанавливают либо стерильной водой для инъекций, фармакопея США (SWFI), либо 0,9% инъекцией хлорида натрия, фармакопея США. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяют в растворе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему изобретению состоит из около 4,5 мл воды для инъекций и разбавляют 0,9% солевым раствором (раствор хлорида натрия).

[139] Белковые композиции могут быть стерилизованы обычными методами 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. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в несколько однодозовых емкостей, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для изменяемого количества.

[140] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут быть изменены таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

[141] Конкретная доза может представлять собой унифицированную дозу для каждого пациента, например, 50-5000 мг белка. Альтернативно, доза пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или патологическое состояние, которое нужно лечить или предупреждать, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Специалисты в данной области техники обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозировки для лечения, особенно в свете информации о дозировке и тестов, раскрытых в настоящем документе. Дозировка также может быть определена путем использования известных анализов для определения доз, используемых

вместе с соответствующими данными доза-ответ. Дозировка индивидуального пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием заболевания. Уровни в крови целевой конструкции или комплекса у пациента могут быть измерены, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может быть использована для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы, и их дозировки, наиболее вероятно, будут эффективными для данного индивидуума (Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[142] В общем, дозировки, основанные на массе тела, находятся в пределах от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, например, от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 0,1 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мг до около 100 мг/кг массы тела. 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 для дозирования на основании измеренных времен пребывания и концентраций целевой конструкции или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению, может быть внутривенным, внутриартериальным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривнутриплевральным, интратекальным, внутривнутриполостным, с помощью перфузий через катетер или с помощью прямой инъекции в очаг поражения. Они могут

вводиться 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.

Усиление гибели опухолевых клеток и лечение рака

[143] Изобретение относится к способам усиления гибели опухолевых клеток и/или лечению рака у пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает воздействие на опухолевые клетки и естественные клетки-киллеры мультиспецифическим связывающим белком, раскрытым в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества белка и/или его желаемого состава, описанного в настоящем документе. В таковых вариантах осуществления, мультиспецифический связывающий белок может содержать: антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, 83, 84, 85, 86 или 87, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; или антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[144] Тип рака, подлежащего лечению, желателно соответствует типу раковой клетки, с которой связывается мультиспецифический связывающий белок, описанный в настоящем документе. Например, лечение рака экспрессирующего молекулы адгезии эпителиальных клеток, (EрСАМ), такого как рак толстой кишки, экспрессирующий EрСАМ, желателно лечить с использованием описанного в настоящем документе мультиспецифического связывающего белка, который связывается с EрСАМ и NKG2D.

[145] В некоторых вариантах осуществления пациенты, подлежащие лечению, содержат раковые клетки, которые экспрессируют одно или более из следующего: CD33, HER2, CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, CEA, сMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1. В некоторых вариантах осуществления пациенты, подлежащие лечению, имеют солидный рак, такой как рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легкого, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почек, рак желудка, рак яичка или рак матки. В других вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточный рак, аденокарциному, мелкоклеточный рак, 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, аденоидно-кистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анальной части прямой кишки, рак анального канала, рак прямой кишки, астроцитарной опухоли, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак костей, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхиальной железы, нейроэндокринные опухоли, холангиокарциному, хондросаркому, папиллому/карциному сосудистой оболочки, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, эндодермальную опухоль, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому матки, эндометриоидную аденокарциному, рак эндотелиоцитов, эпендимальный рак, рак эпителиальных клеток, саркому Юинга, рак глаз и глазницы, рак женских половых органов, фокальную нодулярную гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак свода желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластому, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденому печени, печеночный аденоматоз, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интраэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутрпеченочного желчного протока, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак сустава, саркому Капоши, рак таза,

крупноклеточный рак, рак толстой кишки, лейомиосаркому, меланому лентиго, лимфому, рак половых органов у мужчин, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак ротовой полости, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному узелковую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, мелкоклеточный рак, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркома, папиллярная серозная аденокарцинома, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмцитому, псевдосаркому, бластому легкого, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозный рак, рак пазухи, рак кожи, мелкоклеточный рак, рак тонкой кишки, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточный рак, поперечно-полосатый рак мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеочника, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочевой системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному ВИПо, рак вульвы, высокодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

[146] В некоторых вариантах осуществления пациенты, подлежащие лечению, имеют 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 В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, мантийноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток краевой зоны, узловая В-клеточная лимфома из клеток краевой зоны, В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки, лимфома Беркитта, лимфоплазмочитарная лимфома, волосатоклеточный лейкоз или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как предшественник Т-лимфобластной лимфомы, периферическую Т-клеточную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, внеузловую Т-клеточную лимфому из естественных киллеров, Т-клеточную лимфому энтеропатического типа, Т-клеточную лимфому типа подкожного панникулита, анапластическую крупноклеточную лимфому или периферическую Т-клеточную лимфому.

[147] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе белки используются в сочетании с дополнительными терапевтическими агентами для лечения пациентов с раком. Типичные терапевтические агенты, которые могут быть использованы в качестве части комбинированной терапии при лечении рака, включают,

например, облучение, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронит, метотрексат, доксорубицин, карбокон, пентостатин, нитрактин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, недаплатины, цитарабин, бикалутаид, винорелбин, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутамид, дрогенил, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофиан, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфамид, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостат, эпитиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин дифитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и вариации вышеупомянутых агентов, которые могут проявлять дифференциальное связывание с соответствующим родственным рецептором, а также увеличивать или уменьшать период полувыведения из сыворотки.

[148] Дополнительным классом агентов, которые могут использоваться в качестве части комбинированной терапии при лечении рака, являются ингибиторы иммунной контрольной точки. Типичные ингибиторы иммунной контрольной точки включают агенты, которые ингибируют один или более из (i) цитотоксического ассоциированного с Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4), (ii) белка запрограммированной смерти клетки 1 (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.

[149] Тем не менее, другие агенты, которые могут быть использованы в качестве части комбинированной терапии при лечении рака являются моноклональными антителами, которые нацелены не на мишени контрольной точки (*например*, герцептин) и не-цитотоксические агенты (*например*, ингибиторы тирозин-киназы).

[150] Еще другие категории противораковых агентов включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора эксцизионной репарации оснований ДНК, ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl, ингибитор тирозинкиназы Брутона, ингибитор CDC7, ингибитор CHK1, ингибитор циклин-зависимой киназы, ингибитор ДНК-ПК, ингибитор ДНК-ПК mTOR, ингибитор DNMT1, ингибитор DNMT1 плюс 2-хлордезоксиденозин, ингибитор HDAC, ингибитор сигнального пути Hedgehog, ингибитор IDO, ингибитор JAK, ингибитор mTOR, ингибитор MEK, ингибитор MELK, ингибитор MTH1, ингибитор PARP, ингибитор фосфоинозитид-3-киназы, ингибитор обоих как PARP1, так и DNODH, ингибитор протеасомы, ингибитор топоизомеразы-II, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор VEGFR и ингибитор 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.

[151] Белки по настоящему изобретению также можно использовать в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного опухолевого очага.

[152] Количество белка и дополнительного терапевтического агента и относительные сроки введения могут быть выбраны для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при назначении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации или фармацевтическую композицию, или композиции, содержащие терапевтические агенты, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, одновременно, вместе, одновременно и тому подобное. Кроме того, например, описанный в настоящем документе белок можно вводить в течение времени, когда дополнительный терапевтический агент(ы) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

[153] Вышеприведенное описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения. В заявке на патент конкретно рассматриваются все комбинации и варианты аспектов, и вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

[154] Теперь настоящее изобретение, в целом описанное ранее, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1 - Аффинность связывания различных NKG2D-связывающих доменов

[155] Кинетику и аффинность различных NKG2D-связывающих доменов оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore 8K (GE Healthcare). Антитело к Fc человека иммобилизовали на чипе CM5 с использованием стандартной химии аминного сочетания. Моноклональные антитела человека, содержащие различные NKG2D-связывающие домены, захватывали на античеловеческом Fc-чипе при плотности приблизительно 100 ОЕ. Растворы, содержащие 0,411-100 нМ растворимых димеров Fc-человека NKG2D мыши, инъецировали поверх захваченных антител к NKG2D и контрольных поверхностей при 30 мкл/мин при 37 °С. Поверхности регенерировали между циклами быстрой инъекцией 10 мМ глицина, pH 1,8. Для получения кинетических констант скорости данные с двойной ссылкой были адаптированы к модели взаимодействия 1: 1 с использованием программного обеспечения Biacore 8K Evaluation (GE Healthcare). Константу равновесия связывания K_D определяли как отношение константы диссоциации k_d и константы ассоциации k_a (k_d/k_a). Как показано в Таблице 9 и на Фиг. 3, аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов с NKG2D находится в диапазоне 10-62 нМ.

Таблица 9			
NKG2D-связывающий домен	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
ADI-27744 (A44)	2,95E+05	2,99E-03	10,1
ADI-27749 (A49)	3,95E+05	4,89E-03	12,4
ADI-29378 (E78)	8,32E+05	4,87E-02	58,5
ADI-29379 (E79)	4,43E+05	2,25E-02	50,7
ADI-29463 (F63)	1,64E+06	1,01E-01	61,8

Пример 2 - Эпитоп-специфическая сортировка по связыванию клон ADI-27744

[156] Сортировку NKG2D-связывающего домена ADI-27744 (A44) проводили против серии антител и ULBP6 (естественный лиганд NKG2D) с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore 8K. Вкратце, Fc мыши - NKG2D человека был захвачен с использованием антитела к Fc мыши, иммобилизованного на чипе CM5 при плотности около 100 ОЕ. За этим последовали последовательные инъекции антител, включая моноклональное антитело к NKG2D, содержащее ADI-27744, ADI-27749, F47 (последовательности перечислены ниже) или 1D11 (коммерческое моноклональное антитело к NKG2D), ULBP6 (последовательность приведена ниже), MS (антитело к NKG2D от Novo Nordisk, последовательности перечислены ниже) и MAB139 (антитело к NKG2D от R&D system, клон 149810) при 30 мкл/мин при 25 °С. Для анализа всех данных использовалось программное обеспечение Biacore 8K.

Таблица 10

	Вариабельная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи
F47	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGG GSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDH SGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDP WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:51) CDR1 (SEQ ID NO:52) - GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:53) - EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:54) - ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDTFITF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:55) CDR1 (SEQ ID NO:56) - RASQSISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:57) - KASSLES CDR3 (SEQ ID NO:58) - QQYDTFIT
MS	QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSD	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA

SISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYS GSANYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWG QGTMVTVSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO:60) - SYYWS CDR2 (SEQ ID NO:61) - HISYSGSANYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:62) - WDDAFNI	SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFL LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPW TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:63) CDR1 (SEQ ID NO:64) - RASQSVSSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:65) - GASSRAT CDR3 (SEQ ID NO:66) - QQYGSSPW
---	--

[157] Аминокислотная последовательность ULBP SEQ ID NO: 67:

RRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGVDEKTFLLHYDCGKNTVTPVSPLGK
 KLNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSG
 SWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWL
 EDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSG

[158] Фиг. 4А показывает профиль инъекции моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744, поверх иммобилизованного NKG2D с последующей инъекцией ULBP6. Фиг. 4В показывает профиль инъекции ULBP6 поверх иммобилизованного NKG2D с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, включая ADI-27744. Эти результаты показывают, что моноклональное антитело к NKG2D включая антигенсвязывающий участок ADI-27744 не блокирует связывание ULBP6 с NKG2D, т.е., ADI-27744 связывается с другим эпитопом на NKG2D относительно ULBP6.

[159] Фиг. 4С показывает профиль инъекции моноклонального антитела MS поверх NKG2D с последующей инъекцией ULBP6. Моноклональное антитело MS блокирует связывание ULBP6 с NKG2D. Фиг. 4D-F показывает профиль инъекции MS, 1D11 или MAB139 поверх иммобилизованного NKG2D с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744. Фиг. 4G-H показывает профиль инъекции моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27744, поверх иммобилизованного NKG2D с последующей инъекцией моноклонального антитела к NKG2D, содержащего ADI-27749 или F47. ADI-27744 не блокирует связывание MS, 1D11 и MAB139 с NKG2D. ADI-27749 и F47 не блокируют связывание ADI-27744 с NKG2D. Эти результаты показывают, что ADI-27744 связывается с уникальным эпитопом на NKG2D, в отличие от MS, 1D11, MAB139, ADI-27749 и F47-связывающего эпитопа(ов).

Пример 3 - Триспецифические связывающие белки связываются с NKG2D

[160] Линии клеток EL4 лимфомы мыши были сконструированы для экспрессии NKG2D человека. Триспецифические связывающие белки (TriNKET), каждый из которых содержит NKG2D-связывающий домен, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (такой как CD33- или HER2-связывающий домен) и Fc-домен, который связывается

с CD16, как показано на Фиг. 1, анализировали на их аффинность к внеклеточному NKG2D, экспрессированному на клетках EL4. Связывание мультиспецифических связывающих белков с NKG2D определяли с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали соотношение сигнала по сравнению с фоном (FOB) с использованием среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) NKG2D-экспрессирующих клеток по сравнению с исходными клетками EL4.

[161] Анализированные TriNKET включают CD33-TriNKET-A44 (ADI-27744 и домен связывания CD33), CD33-TriNKET-A49 (ADI-27749 и домен связывания CD33), CD33-TriNKET-F63 (ADI-29463 и CD33-связывающий домен), HER2-TriNKET-A44 (ADI-27744 и CD33-связывающий домен), HER2-TriNKET-A49 (ADI-27749 и HER2-связывающий домен), HER2-TriNKET-F63 (ADI-29463 и HER-связывающий домен), и HER2-TriNKET-E79 (ADI-29379 и HER2-связывающий домен). HER2-связывающий домен состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи трастузумаба. CD33-связывающий домен состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи указанной ниже.

SEQ ID NO:49

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYVVHWVRQAPGQGLEWMGYINPYND

CDR1

GTKYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYRYEVYGMDYWGQ

CDR2

CDR3

GTLVTVSS

SEQ ID NO:50

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCTASSSVNYIHWYQQKPGQPPLLIYDTSKVASGVPAR

CDR1

CDR1

FSGSGSGTDFLTINPVEANDTANYYCQQWRSYPLTFGQGTKLEIK

CDR3

[162] Все TriNKET связывают NKG2D на поверхности клеток EL4, но с разной аффинностью. CD33-TriNKET-A44 показывают тот же профиль связывания, что и HER2-TriNKET-A44, также как и CD33-TriNKET-A49, как HER2-TriNKET-A49 и CD33-TriNKET-F63 для HER2-TriNKET-F63. NKG2D-связывающая аффинность для каждого клона была сходной между клетками, экспрессирующими NKG2D человека и мыши (Фиг. 5-6).

Пример 4 - Триспецифические связывающие белки связываются с опухолевыми антигенами человека

Триспецифические связывающие белки связываются с CD33

[163] Клеточную линию ОМЛ человека MV4-11, экспрессирующую CD33, использовали для анализа связывания TriNKET с опухоль-ассоциированным антигеном. TriNKET и родительское моноклональное антитело к CD33 инкубировали с клетками, и связывание детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных

антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали соотношение сигнала по сравнению с фоном (FOB) с использованием среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) от TriNKET и родительского моноклонального антитела к CD33, нормализованного к контрольным вторичным антителам.

[164] CD33-TriNKET-A44, CD33-TriNKET-A49 и CD33-TriNKET-F63 показывают сопоставимые уровни связывания с CD33 по сравнению с родительским антителом к CD33 (Фиг. 7).

Триспецифические связывающие белки связываются с HER2

[165] Клеточные линии рака человека, экспрессирующие HER2, использовали для анализа связывания TriNKET с опухоль-ассоциированным антигеном. Клеточная линия 786-О рака почек экспрессирует низкий уровень HER2, а клеточная линия NCI-H661 рака легкого человека экспрессирует умеренные уровни HER2. TriNKET и, необязательно, родительское моноклональное антитело к HER2 (трастузумаб) инкубировали с клетками, и связывание определяли, используя конъюгированные с флуорофором вторичные антитела к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали соотношение сигнала по сравнению с фоном (FOB) с использованием среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) от TriNKET и трастузумаба, нормализованного к контрольным вторичным антителам.

[166] HER2-TriNKET-A44, HER2-TriNKET-A49 и HER2-TriNKET-F63 показывают сопоставимые уровни связывания с HER2, экспрессируемым на поверхности клеток 786-О, по сравнению с трастузумабом (Фиг. 8). Показано связывание HER2-TriNKET-E79 с HER2, экспрессируемым на поверхности клеток NCI-H661 (Фиг. 9).

Пример 5 - Триспецифические связывающие белки активируют НК-клетки

[167] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. НК-клетки (CD3⁻ CD56⁺) выделяли с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных бус из PBMC, и чистота выделенных НК-клеток обычно составляла > 90%. Выделенные НК-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2 для активации, или оставляли на ночь без цитокина. IL-2-активированные НК-клетки использовали в течение 24-48 часов после активации.

[168] Раковые клетки человека, экспрессирующие опухолевый антиген собирали и ресуспендировали в культуральной среде при 2×10^6 клеток/мл. Моноклональные антитела или TriNKET, нацеленные на опухолевый антиген, разводили в культуральной среде. Активированные НК-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при 2×10^6 клеток/мл в культуральной среде. Затем раковые клетки смешивали с моноклональными антителами/TriNKET и активировали НК-клетки в присутствии IL-2. Брефельдин-А и монензин также добавляли в смешанную культуру для блокирования транспорта белка из клетки для внутриклеточного окрашивания цитокинов. Конъюгированное с флуорофором антитело к CD107a добавляли к смешанной культуре и культуру инкубировали в течение 4

часов перед тем, как образцы были подготовлены для анализа FACS с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, CD56 и IFN-гамма. CD107a и IFN-гамма-окрашивание было проанализировано в CD3⁻ CD56⁺ клетках для оценки активации NK-клеток. Увеличение числа двойных положительных клеток CD107a/IFN-гамма свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет вовлечения двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора.

[169] TriNKET опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивируемых с HER2-экспрессирующими клетками NCI-H661 (Фиг. 10) и клетками SkBr-3 (Фиг. 11) соответственно, как показано увеличением дегрануляции CD107a и выработки IFN-гамма. По сравнению с моноклональным антителом трастузумабом, TriNKET демонстрируют превосходную активацию NK-клеток человека в присутствии раковых клеток человека.

[170] TriNKET опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивированных с CD33-экспрессирующими клетками человека ОМЛ Mv4-11 как показано увеличением дегрануляции CD107a и выработки IFN-гамма (Фиг. 12). По сравнению с моноклональным антителом к CD33, TriNKET демонстрируют превосходную активацию NK-клеток человека в присутствии раковых клеток человека.

ПРИМЕР 6 - Триспецифические связывающие белки приводят к цитотоксичности по отношению к раковым клеткам-мишеням

[171] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки (CD3⁻ CD56⁺) выделяли с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных бус из PBMC, и чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90%. Выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2 для активации, или оставляли на ночь без цитокина. Активированные IL-2 или покоящиеся NK-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

[172] Чтобы проверить способность NK-клеток человека лизировать раковые клетки в присутствии TriNKET, использовали анализ нерадиоактивной цитотоксичности cyto Tox 96 от Promega (G1780) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, раковые клетки человека, экспрессирующие опухолевый антиген собирали, промывали и ресуспендировали в культуральной среде при $1-2 \times 10^5$ клеток/мл. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при $10^5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл в тех же культуральных средах, как и для раковых клеток. В каждой лунке 96-луночного планшета 50 мкл суспензии раковых клеток смешивали с 50 мкл суспензии NK-клеток с или без TriNKET, нацеленных на опухолевый антиген, экспрессируемый на раковых клетках. После инкубации при 37°C с 5% CO₂ в течение 3 часов и 15 минут, 10x кратный буфер для лизиса добавляли в лунки, содержащие только раковые клетки, и в лунки, содержащие только среды для максимального лизиса и отрицательного контроля реагентов, соответственно. Затем планшет помещали обратно в инкубатор на

дополнительные 45 минут для достижения общей 4-часовой инкубации. Затем клетки осаждали, и культуральный супернатант переносили в новый 96-луночный планшет и смешивали с субстратом для развития. Новый планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, и оптическую плотность считывали при 492 нм на SpectraMax i3x. Процент специфического лизиса раковых клеток рассчитывали следующим образом: % Специфический лизис = ((экспериментальный лизис - самопроизвольный лизис только из НК-клеток - самопроизвольный лизис только из раковых клеток)/(Максимальный лизис - отрицательный контроль реагентов)) * 100%

[173] TriNKET опосредуют цитотоксичность НК-клеток человека против CD33-положительной линии клеток ОМЛ человека Molm-13. Как показано на Фиг. 13, покоящиеся НК-клетки человека были смешаны с раковыми клетками Molm-13, и TriNKET способны повысить цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток человека дозозависимым образом против клеток рака. Пунктирная линия указывает на цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток без TriNKET. Как показано на Фиг. 14, активированные НК-клетки человека были смешаны с раковыми клетками Molm-13, и TriNKET повышают цитотоксическую активность активированных НК-клеток человека даже больше дозозависимым образом против раковых клеток.

[174] TriNKET опосредуют цитотоксичность НК-клеток человека против HER2-положительной линии раковых клеток почек человека 786-О. Как показано на Фиг. 15, покоящиеся НК-клетки человека были смешаны с раковыми клетками 786-О, и TriNKET способны повысить цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток человека дозозависимым образом против раковых клеток (каждый TriNKET был добавлен в концентрации 5, 1, 0,2 мкг/мл в анализе, и результаты представлены в 3 столбцах слева направо в каждом TriNKET на Фиг. 15-16). Пунктирная линия указывает на цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток против клеток 786-О в отсутствие TriNKET. Как показано на Фиг. 16, активированные НК-клетки человека были смешаны с раковыми клетками 786-О, и TriNKET повышают цитотоксическую активность активированных НК-клеток человека даже больше дозозависимым образом против раковых клеток. Пунктирная линия указывает на цитотоксическую активность активированных НК-клеток против клеток 786-О в отсутствие TriNKET.

Пример 7 - Варианты ADI-27749 и TriNKET, содержащие варианты.

[175] Как описано выше, ADI-27749 (A49) содержит, среди прочего, тяжелую цепь CDR3 имеющую аминокислотную последовательность GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 71). Met в положении 102 SEQ ID NO: 7 (*m.e.*, в положении 4 этой последовательности CDR3) может быть заменен на Gln, Leu, Ile, Phe или Val, тем самым генерируя антитела к NKG2D A49MQ, A49ML, A49MI, A49MF и A49MV, соответственно, имеющие соответствующую вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи и последовательности CDR, представленные в Таблице 1.

[176] Эффекты этих мутаций на гидрофобность были проанализированы с помощью программы MOE2018.01 с использованием параметров avg_pro_patch_cdr_hyd. Остатки

мутировали с использованием модуля белка-строителя, и весь Fab был минимизирован после присоединения всех остатков. Динамическая выборка свойств была выполнена с использованием протокола lowMD в BIOMOE. Как показано в Таблице 11, эти мутации не оказали существенного отрицательного влияния на прогнозируемую гидрофобность A49 Fab.

Таблица 11	
Аминокислотный остаток	avg_pro_patch_cdr_hyd
M	524,0968
L	529,67743
I	551,93549
V	477,09677
Q	447,09677
F	542,25806

[177] Гидрофобность TriNKET, содержащего A49 («TriNKET A») и мутантной формы TriNKET A, имеющей замену Ile, Leu, Val, Gln или Phe на Met («TriNKET A*»), тестировали аналитической хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC). Каждый из TriNKET также связан с первым опухолевым антигеном. Как показано в Таблице 12, время удерживания TriNKET A* было таким же, как и у TriNKET A.

Таблица 12	
Белок	Время удержания
ET A*	8,6 мин
TriNKET A	8,65 ± 0,05 мин

[178] Термическую стабильность TriNKET A и TriNKET A* исследовали с помощью дифференциального сканирующего калориметрического анализа (ДСК) в 20 мМ гистидине, 260 мМ сахарозе и 0,005% PS-80 при pH 6,0. Значения T_m приведены в Таблице 13, где T_m представляет собой среднюю точку температуры перехода отдельного домена. Мутация M102 имела небольшой эффект на значение T_m двух наиболее стабильных переходов (T_{m3} и T_{m4}), со сдвигом на 0,6 и 0,7 °C ниже, по сравнению с TriNKET A. Более ранние переходы (T_{m1} и T_{m2}) не были затронуты. Следовательно, мутация M102 оказала лишь незначительное влияние на общую термостабильность TriNKET A.

Таблица 13				
Белок	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}
TriNKET A	66,2	80,2	86,3	88,4
TriNKET A*	66,2	80,5	85,7	87,7

[179] Связывание TriNKET A и TriNKET A* с белком слияния NKG2D человека и Fc мыши («mFc-hNKG2D») характеризовали поверхностным плазмонным резонансом (SPR) при 37 °C. Для получения данных о равновесной аффинности были использованы две

разных подгонки: подгонка аффинности в равновесном состоянии и подгонка кинетической аффинности (Фиг. 32). Кинетические константы и равновесные константы аффинности были рассчитаны, а данные двух независимых экспериментов для TriNKET A* и трех независимых экспериментов для TriNKET A были усреднены.

Таблица 14						
Захват	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	Кинетика K_D (М)	Равновесная аффинность K_D (М)	Стехиометрия
mFc-hNKG2D	TriNKET A*	$1,41 \times 10^5$	$1,31 \times 10^{-1}$	$9,31 \times 10^{-7}$	$6,98 \times 10^{-7}$	0,86
mFc-hNKG2D	TriNKET A*	$1,56 \times 10^5$	$1,28 \times 10^{-1}$	$8,19 \times 10^{-7}$	$6,76 \times 10^{-7}$	0,85
Среднее		$1,49 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{-1}$	$8,75 \times 10^{-7}$	$6,87 \times 10^{-7}$	0,85
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$1,91 \times 10^5$	$1,16 \times 10^{-1}$	$6,05 \times 10^{-7}$	$4,62 \times 10^{-7}$	1,01
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$2,03 \times 10^5$	$1,06 \times 10^{-1}$	$5,23 \times 10^{-7}$	$4,20 \times 10^{-7}$	0,88
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$1,93 \times 10^5$	$1,15 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-7}$	$5,80 \times 10^{-7}$	1,12
Среднее \pm STDEV		$(1,96 \pm 0,06) \times 10^5$	$(1,12 \pm 0,06) \times 10^{-1}$	$(5,74 \pm 0,45) \times 10^{-7}$	$(4,87 \pm 0,83) \times 10^{-7}$	$1,01 \pm 0,11$

[180] Как показано в Таблице 14, равновесные константы аффинности (K_D), полученные из подгонок аффинности и кинетики были очень похожи между независимыми экспериментами, что свидетельствовало о высокой достоверности измеренных параметров. Вариант M102 имеет менее чем 2-кратное снижение в аффинности к NKG2D человека по сравнению с TriNKET A. K_D TriNKET A* была $(6,87 \pm 0,16) \times 10^{-7}$ М, в то время как K_D TriNKET A была $(4,87 \pm 0,83) \times 10^{-7}$ М (рассчитанная из подгонки аффинности). Подобные различия в аффинности наблюдались, когда K_D рассчитывали с помощью подгонки кинетики. Стехиометрия связывания NKG2D с TriNKET A* была $0,85 \pm 0,12$, аналогично $1,01 \pm 0,11$ для TriNKET A, подтверждая, что каждый димер NKG2D связывается с одной молекулой TriNKET A*. Это говорит о том, что мутация M102 оказала лишь незначительное влияние на связывание A49-содержащего TriNKET с NKG2D человека.

[181] Наконец, влияние мутации M102 на активность TriNKET оценивали в анализе цитотоксичности. Вкратце, клетки KHYG-1, экспрессирующие высокоаффинный вариант CD16a (158 B), получали посредством ретровирусной трансдукции. После трансдукции

клетки отбирали в ростовой среде, содержащей пуромицин, для создания отобранной популяции клеток KHYG-1-CD16V. Отобранную популяцию поддерживали в среде, содержащей 10 нг/мл IL-2 человека. Чтобы подготовить клетки KHYG-1-CD16V для использования в качестве эффекторов в анализах цитотоксичности, клетки собирали из культуры, осаждали, трижды промывали в культуральной среде без IL-2 и ресуспендировали в культуральной среде без IL-2 и оставляли на 24 часа.

[182] Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры. Клетки промывали HBS и ресуспендировали в ростовой среде при 10^6 клеток/мл для мечения BATDA реагентом (Perkin Elmer C136-100). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения, клетки трижды промывали HBS и ресуспендировали при $0,5 \times 10^5$ клеток/мл в культуральной среде. 100 мкл клеток, меченных BATDA, добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета.

[183] TriNKET серийно разводили в культуральной среде, и 50 мкл разбавленного TriNKET добавляли в каждую лунку. Покоящиеся НК-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде. 50 мкл НК-клеток добавляли в каждую лунку планшета для достижения желаемого отношения E: T 10: 1 и для получения общего объема культуры 200 мкл в каждой лунке. Планшет инкубировали при 37 °C с 5% CO₂ в течение 2-3 часов.

[184] После культивирования планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при $200 \times g$ в течение 5 минут. 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем. Супернатант из меченых клеток, инкубированных отдельно без НК-клеток, использовали для измерения спонтанного высвобождения TDA. Супернатант из меченых клеток, инкубированных с 1% Тритон-Х, использовали для измерения максимального лизиса клеток-мишеней. Супернатант из меченых клеток за 2-3 часа до инкубации использовали для измерения фона и в целях контроля качества.

[185] 200 мкл раствора европия при комнатной температуре (Perkin Elmer C135-100) добавляли в каждую лунку, содержащую культуральный супернатант. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 15 минут. Флуоресценцию измеряли с использованием прибора SpectraMax i3X. Уровни флуоресценции представляли лизис клеток-мишеней. % Специфического лизиса рассчитывали как: % Специфического лизиса =
$$\frac{((\text{Экспериментальное высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) / (\text{Максимальное высвобождение} - \text{Спонтанное высвобождение})) \times 100\%.$$

[186] Для измерения активности TriNKET A и TriNKET A* в качестве клеток-мишеней была выбрана клеточная линия, которая экспрессировала первый опухолевый антиген. Для сравнения были использованы две разные партии TriNKET A. Значения % Специфического лизиса были нанесены на Фиг. 33, а значения EC50 и максимальный % специфического лизиса суммированы в Таблице 15. Значения EC50 и максимальный % специфического лизиса TriNKET A* были аналогичны значениям TriNKET A, что

позволяет предположить, что мутация M102 не влияла на биологическую активность TriNKET A.

Таблица 15		
Белок	EC ₅₀ (нМ)	Максимальный лизис (%)
TriNKET A*	0,15	73
TriNKET A - партия 1	0,17	76
TriNKET A - партия 2	0,15	76

[187] Чтобы подтвердить, что отсутствие влияния мутации M102 на активность TriNKET не было специфичным для опухолевого антигена, были сконструированы TriNKET A и TriNKET A*, которые связываются со вторым, отдельным опухолевым антигеном. Активность двух TriNKET сравнивали в анализах цитотоксичности с использованием клеточной линии, которая экспрессировала второй опухолевый антиген в качестве клеток-мишеней, и клеток KHYG-1-CD16V в качестве эффекторных клеток. Как показано на Фиг. 34, TriNKET A* продемонстрировал активность, эквивалентную TriNKET A.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

[188] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящем документе, включено в качестве ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в данном документе. Таким образом, объем настоящего изобретения обозначен прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

2. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность определяющей комплементарность области 1 (CDR1), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

последовательность определяющей комплементарность области 2 (CDR2), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

последовательность определяющей комплементарность области 3 (CDR3), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44.

3. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31.

4. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71.

5. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77.

6. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 78.

7. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

8. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 7, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

9. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 7, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68.

10. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

11. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 10, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19.

12. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 10, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69.

13. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

14. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 13, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25.

15. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 13, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

16. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

17. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 16, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37.

18. Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по п. 16, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит:

последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45;

последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36; и

последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72.

19. Тяжелая цепь антитела, содержащая вариабельный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 1-18 и аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную константной области антитела.

20. Тяжелая цепь антитела по п. 19, отличающаяся тем, что константная область антитела представляет собой константную область IgG человека, содержащую шарнирный, CH2- и CH3-домены.

21. Тяжелая цепь антитела по п. 20, отличающаяся тем, что константная область антитела представляет собой константную область IgG человека, дополнительно содержащую CH1-домен.

22. Тяжелая цепь антитела по любому из пп. 19-21, отличающаяся тем, что константная область антитела на 90% идентична константной области IgG1.

23. Тяжелая цепь антитела по п. 22, отличающаяся тем, что аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела, отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 или K439, или любой их комбинации.

24. Тяжелая цепь антитела по п. 23, отличающаяся тем, что аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела, отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой, выбранной из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, 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, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E, или любой их комбинации.

25. Антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 1-6 и вариабельный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 8.

26. Антигенсвязывающий участок по п. 25, отличающийся тем, что вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

27. Антигенсвязывающий участок по п. 25 или 26, имеющий K_D между 2-120 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

28. Антигенсвязывающий участок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 7-9 и вариабельный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2.

29. Антигенсвязывающий участок по п. 28, отличающийся тем, что переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

30. Антигенсвязывающий участок по п. 28 или 29, имеющий K_D между 5-500 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

31. Антигенсвязывающий участок, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 10-12 и переменный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4.

32. Антигенсвязывающий участок по п. 31, отличающийся тем, что переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

33. Антигенсвязывающий участок по п. 31 или 32, имеющий K_D между 6-600 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

34. Антигенсвязывающий участок, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 13-15 и переменный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6.

35. Антигенсвязывающий участок по п. 34, отличающийся тем, что переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

36. Антигенсвязывающий участок по п. 34 или 35, имеющий K_D между 1-100 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

37. Антигенсвязывающий участок, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп. 16-18 и переменный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10.

38. Антигенсвязывающий участок по п. 37, отличающийся тем, что переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

39. Антигенсвязывающий участок по п. 37 или 38, имеющий K_D между 6-600 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

40. Белок, содержащий:

антигенсвязывающий участок по любому из пп. 25-39, причем антигенсвязывающий участок связывается с NKG2D; и дополнительный антигенсвязывающий участок.

41. Белок по п. 40, отличающийся тем, что дополнительный антигенсвязывающий участок связывается с опухоль-ассоциированным антигеном.

42. Белок по п. 41, отличающийся тем, что опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из CD33, HER2, EpCAM, CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

43. Белок по любому из пп. 40-42, отличающийся тем, что антигенсвязывающий участок, связывающий NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи первого антитела, а дополнительный антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи второго антитела; и

при этом первый вариабельный домен тяжелой цепи антитела присутствует на первом полипептиде, дополнительно содержащем первую константную область антитела, и второй вариабельный домен тяжелой цепи антитела присутствует на втором полипептиде, дополнительно содержащем вторую константную область антитела.

44. Белок по п. 43, отличающийся тем, что первая константная область антитела и вторая константная область антитела образуют комплекс, способный связывать CD16.

45. Белок по п. 43 или 44, отличающийся тем, что каждая из первой константной области антитела и второй константной области антитела содержит шарнирный, CH2- и CH3-домены.

46. Белок по любому из пп. 43-45, отличающийся тем, что каждая первая константная область антитела и вторая константная область антитела дополнительно содержит CH1-домен.

47. Белок по любому из пп. 43-46, отличающийся тем, что аминокислотные последовательности каждой первой константной области антитела и второй константной области антитела по меньшей мере на 90% идентичны константной области IgG1 человека.

48. Белок по п. 47, отличающийся тем, что:

аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 или K439, или любой их комбинации; и

аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, D401, F405, Y407, K409, T411 или K439, или любой их комбинации.

49. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и при этом аминокислотная

константной области IgG1 заменой S354C.

63. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T.

64. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

65. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

66. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

67. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

68. Белок по п. 47, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность первой константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, и при этом аминокислотная последовательность второй константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

69. Белок по любому из пп. 40-42, отличающийся тем, что белок дополнительно содержит антигенсвязывающий участок, способный связывать CD16.

70. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

71. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

72. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

73. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

74. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

75. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с NKG2D человека и/или яванского макака с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

76. Состав, содержащий белок по любому из пп. 40-75 и фармацевтически приемлемый носитель.

77. Клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих белок по любому из пп. 40-75.

78. Способ усиления гибели опухолевых клеток, включающий воздействие на опухоль и естественные клетки-киллеры белка по любому из пп. 40-75.

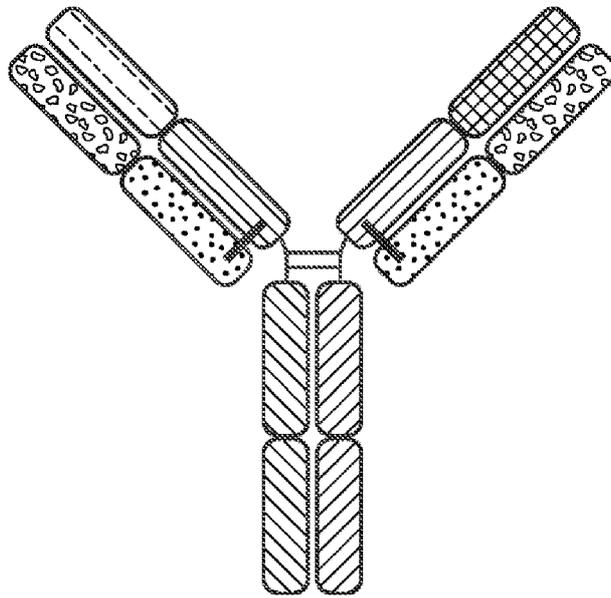
79. Способ лечения рака, включающий введение пациенту белка по любому из пп. 40-75 или состава по п. 76.

80. Способ по п. 79, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечных стромальных опухолей, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной

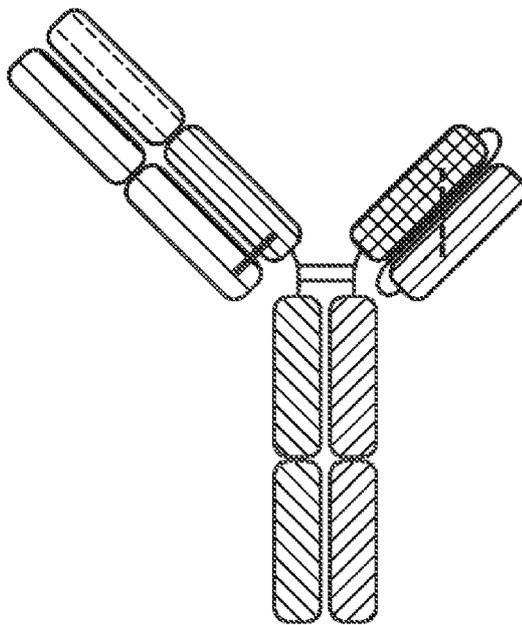
карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, мелкоклеточного рака легкого, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, рака тимуса, рака щитовидной железы, рака уротелия, видов рака, инфильтруемых миелоидными супрессорными клетками, видов рака с отложением внеклеточного матрикса, видов рака с высоким уровнем реактивной стромы и видов рака с неоангиогенезом.

По доверенности

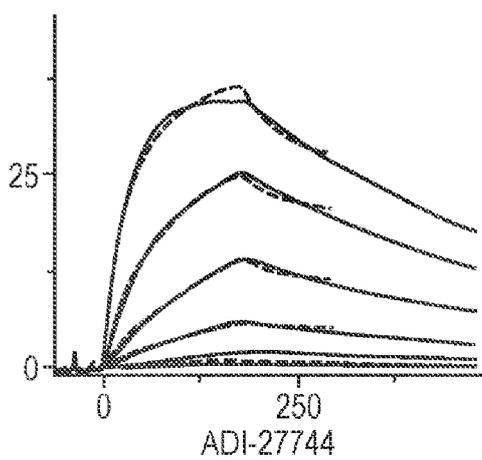
1/20



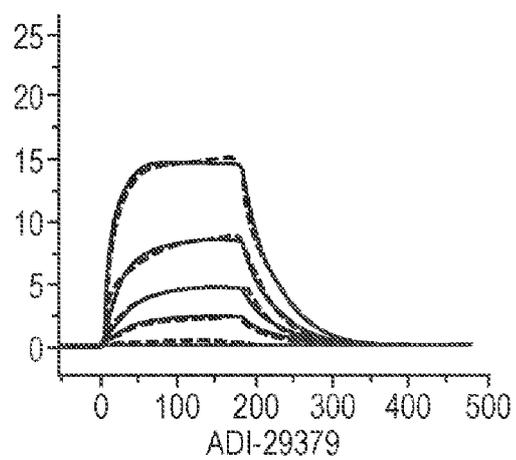
Фиг. 1



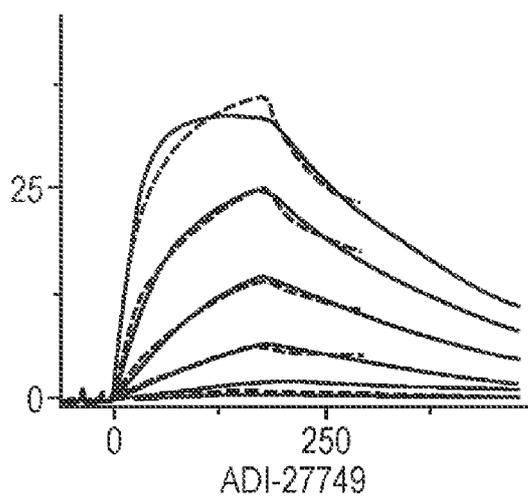
Фиг. 2



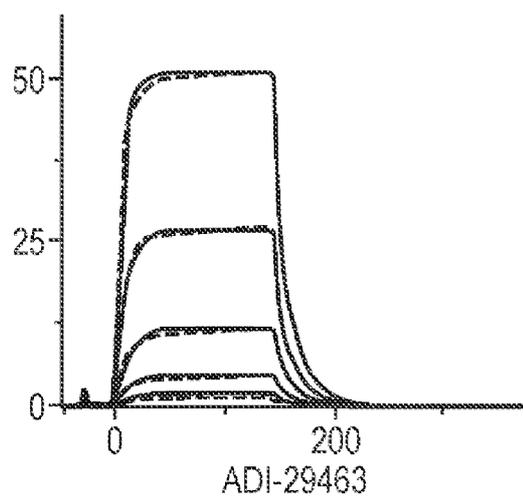
Фиг. 3А



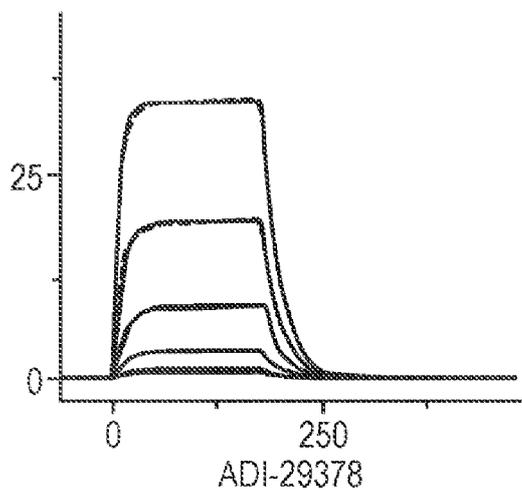
Фиг. 3В



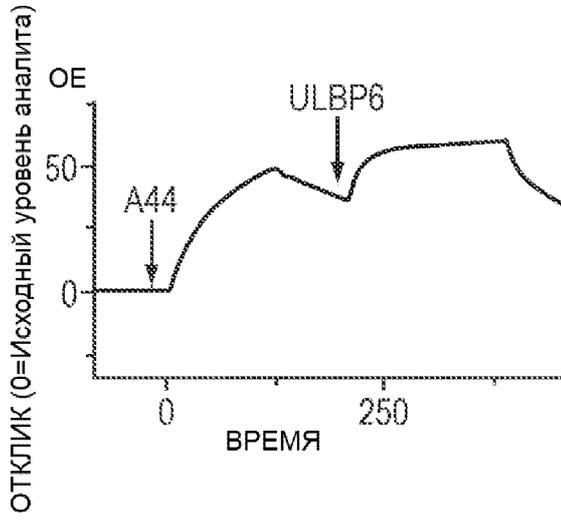
Фиг. 3С



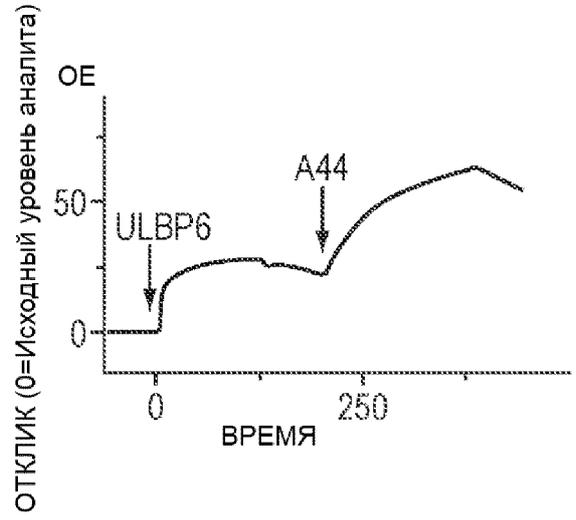
Фиг. 3Д



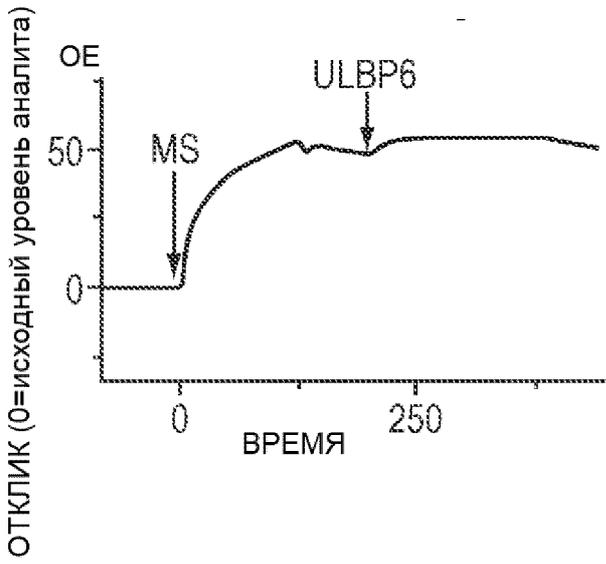
Фиг. 3Е



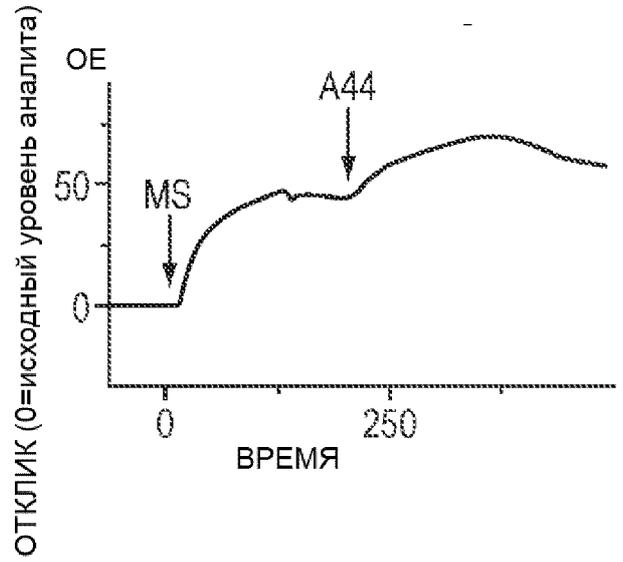
Фиг. 4А



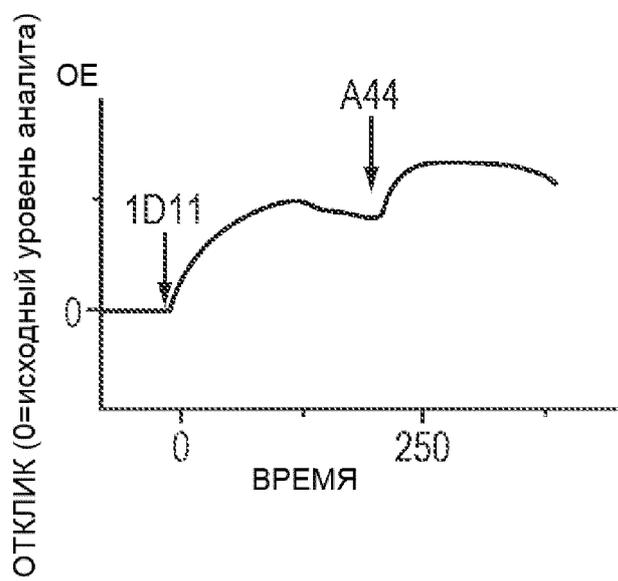
Фиг. 4В



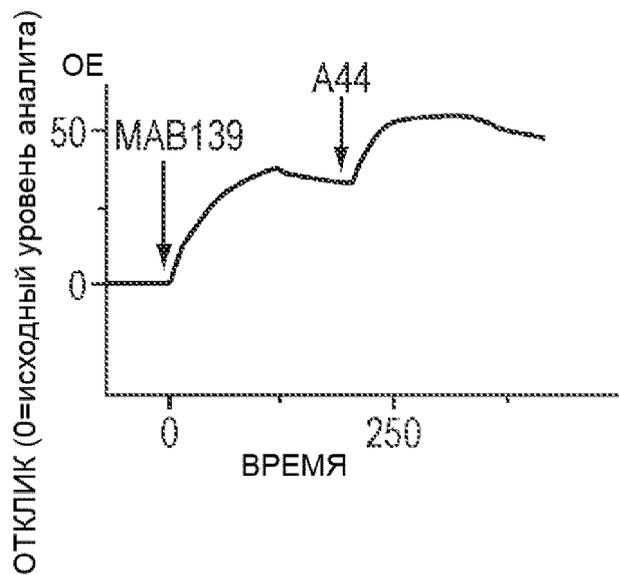
Фиг. 4С



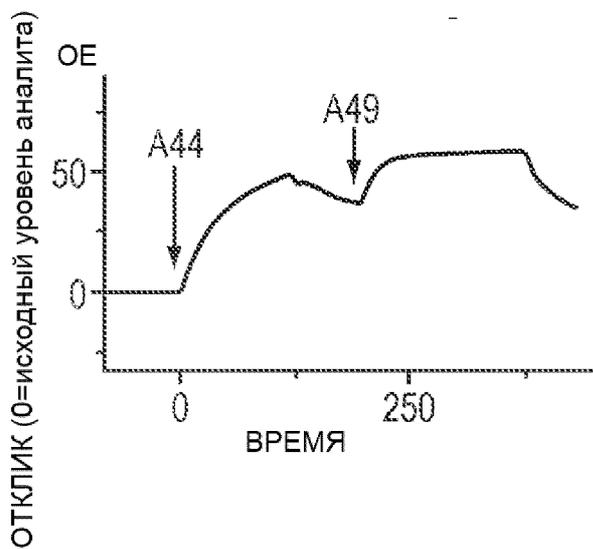
Фиг. 4Д



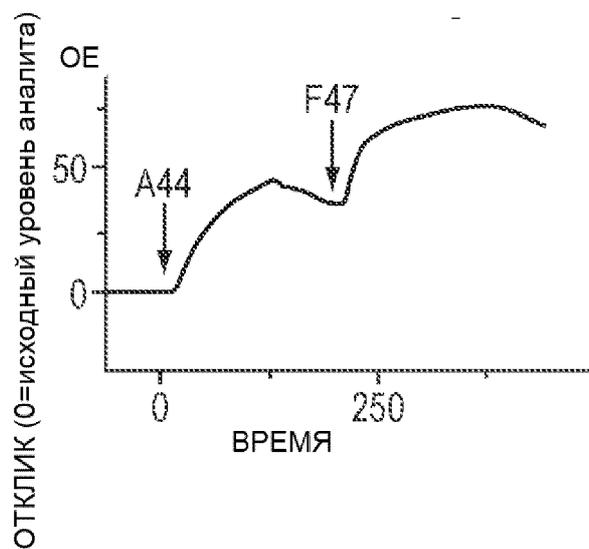
Фиг. 4Е



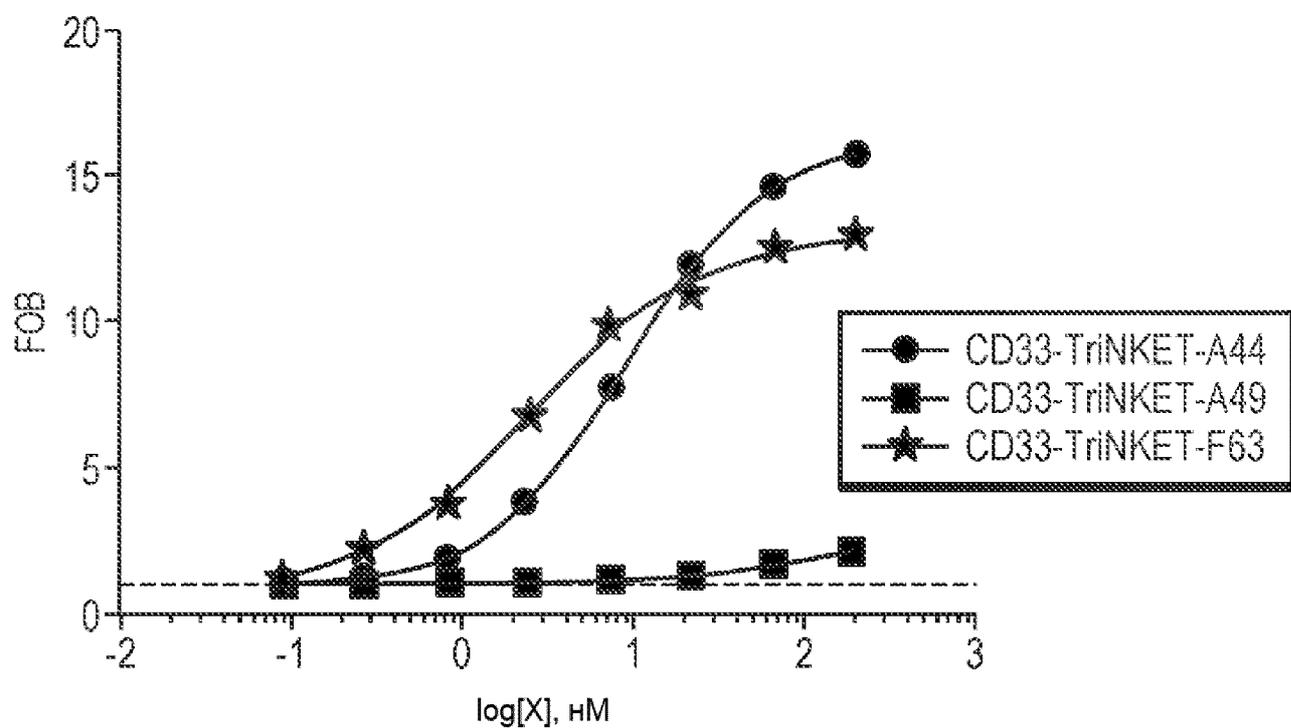
Фиг. 4F



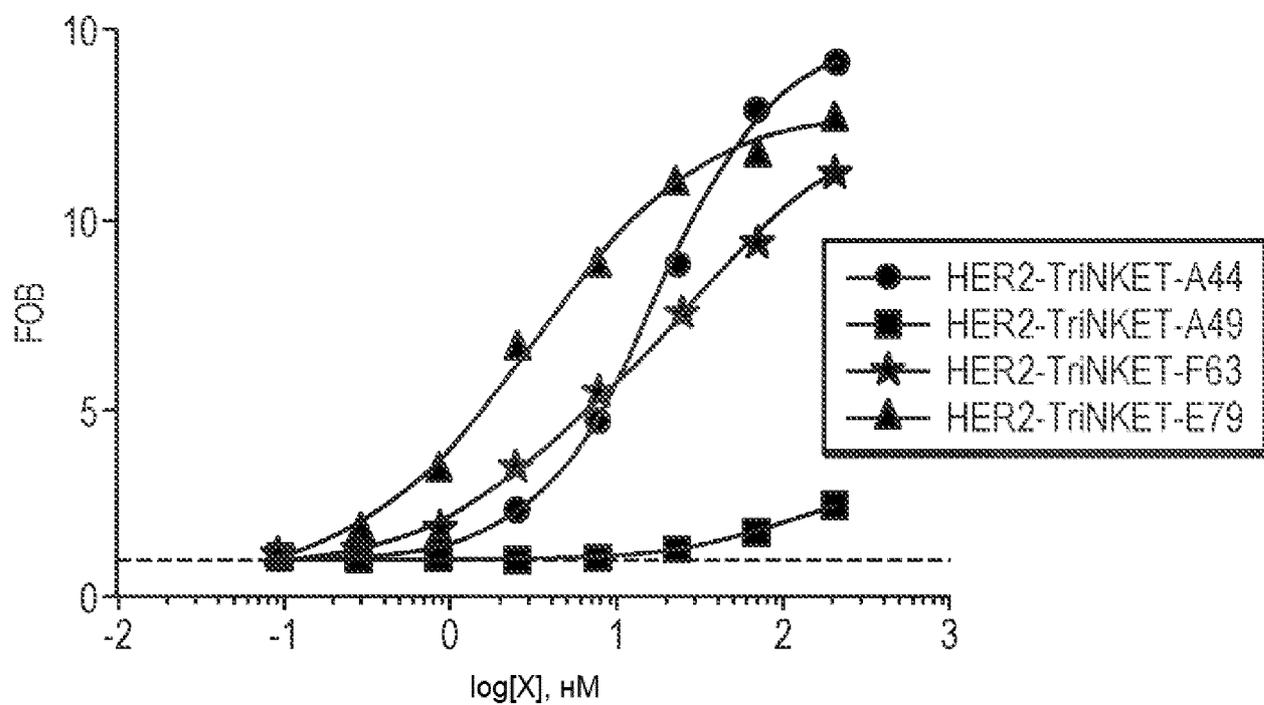
Фиг. 4G



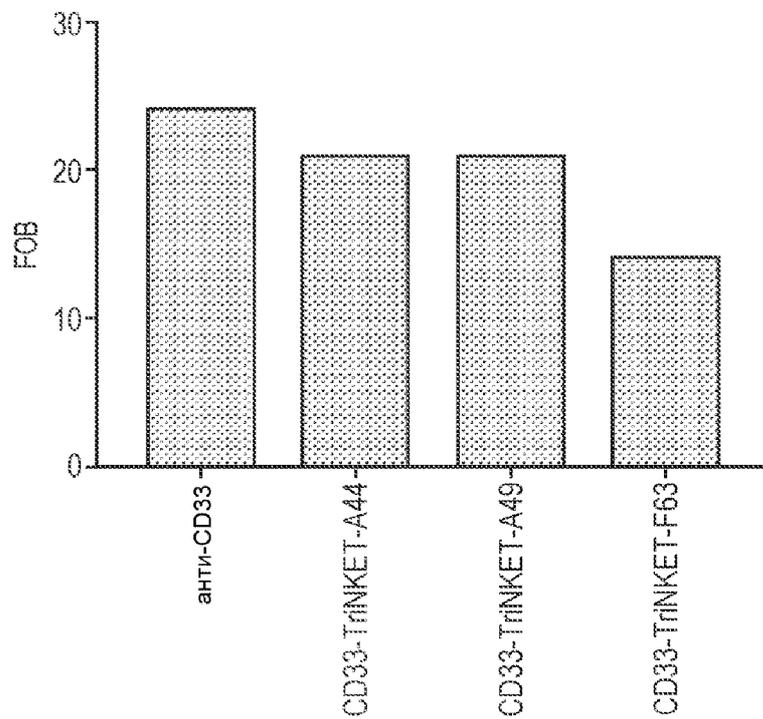
Фиг. 4H



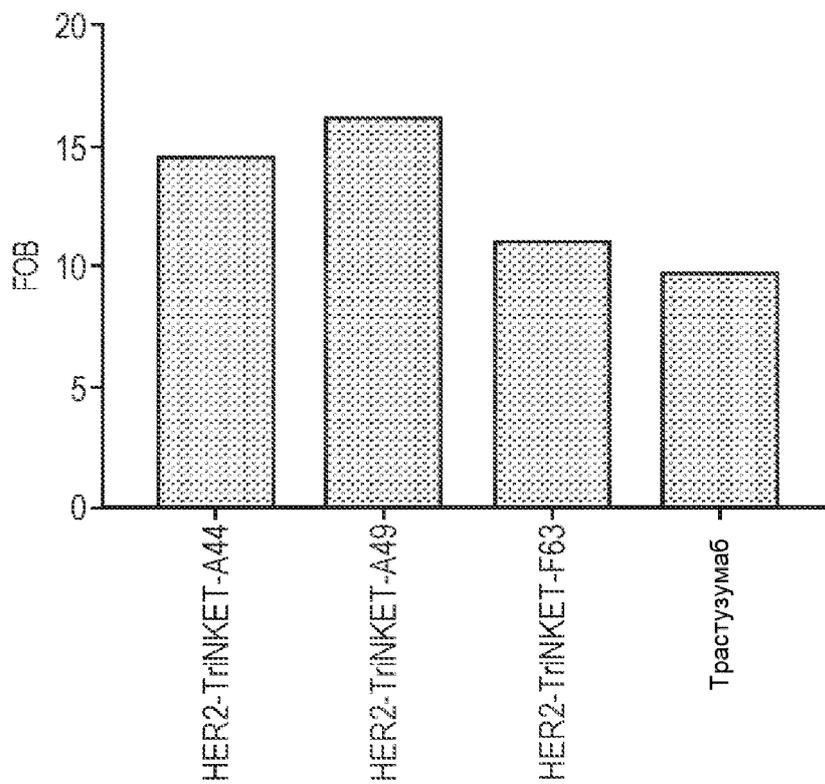
Фиг. 5



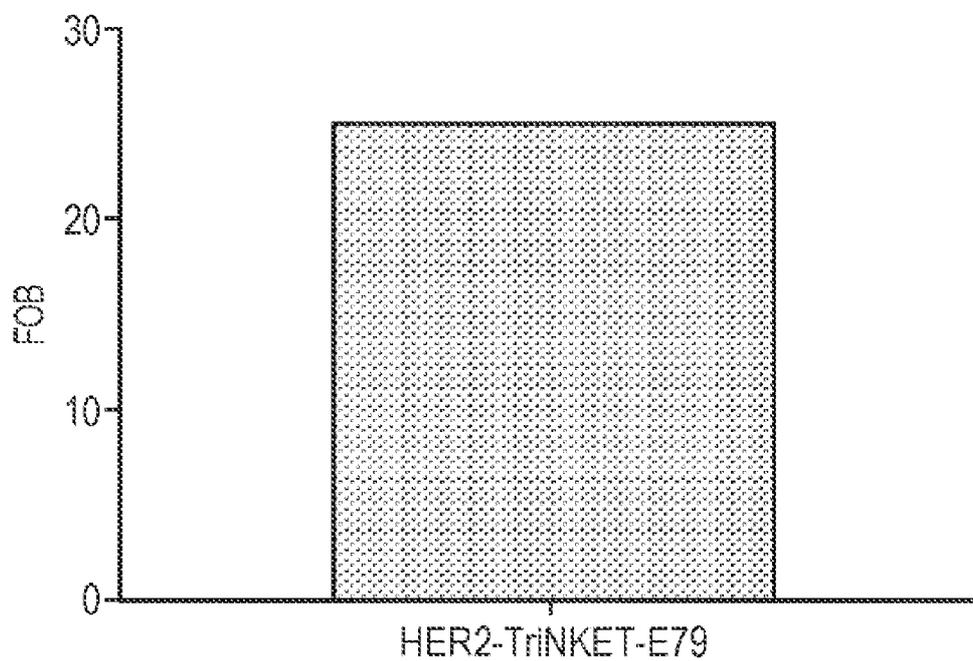
Фиг. 6



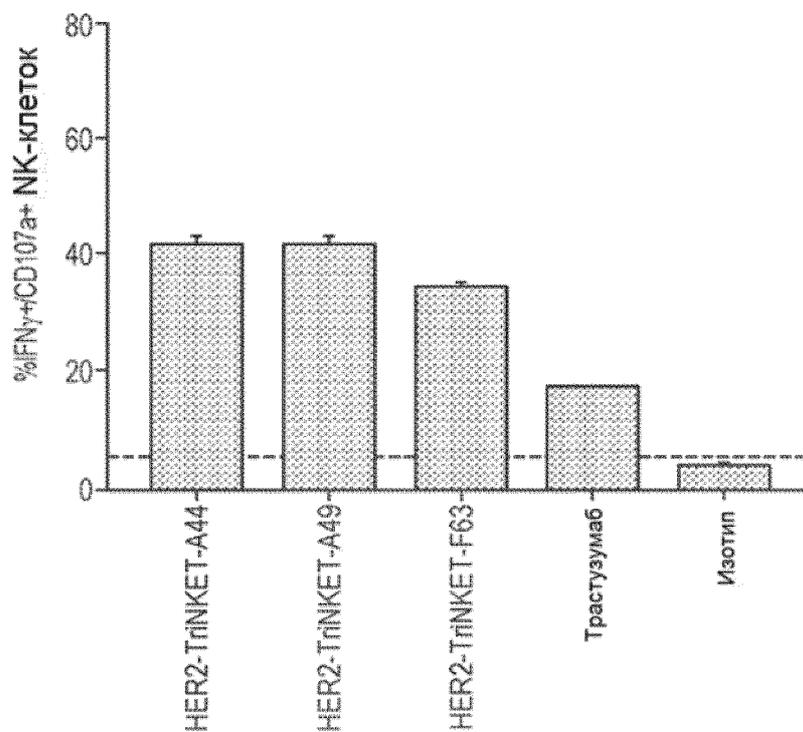
Фиг. 7



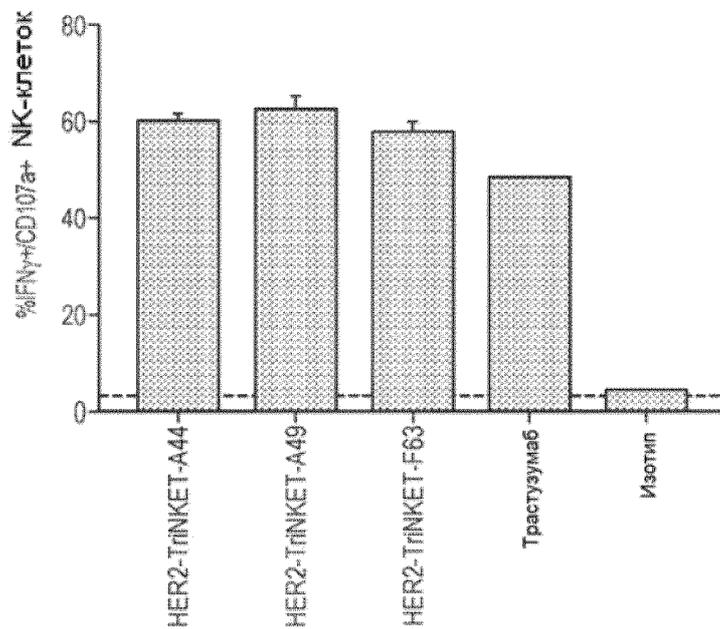
Фиг. 8



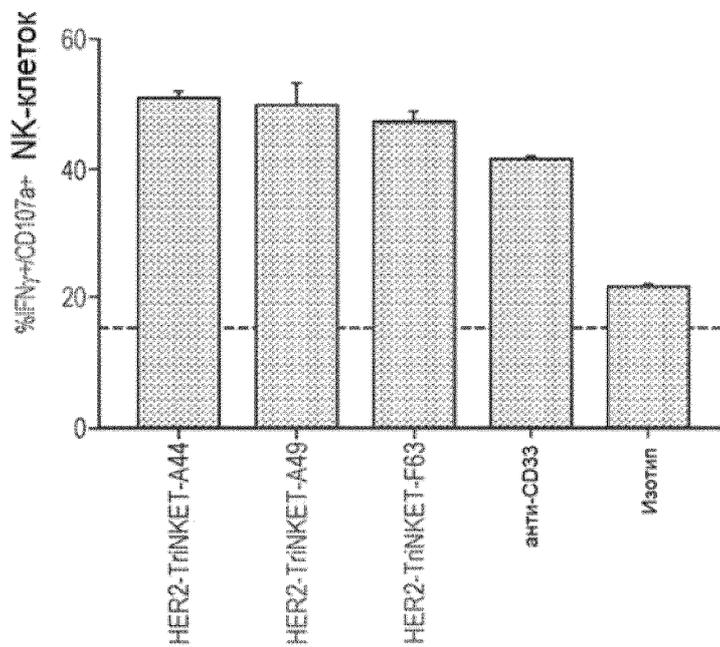
Фиг. 9



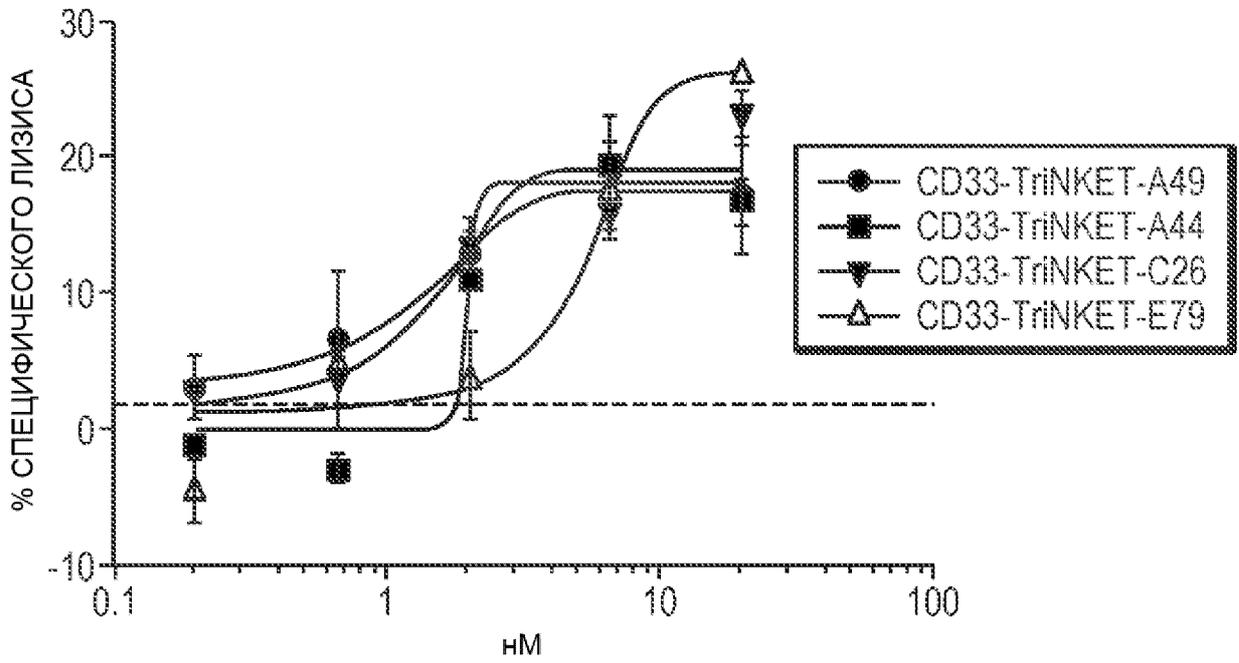
Фиг. 10



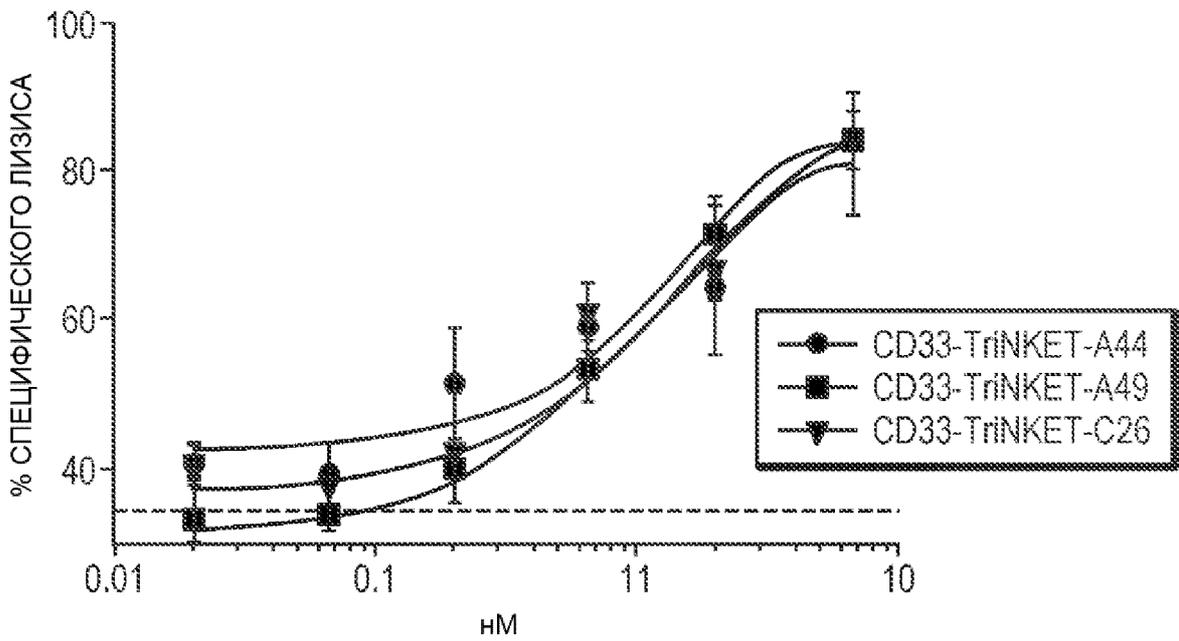
Фиг. 11



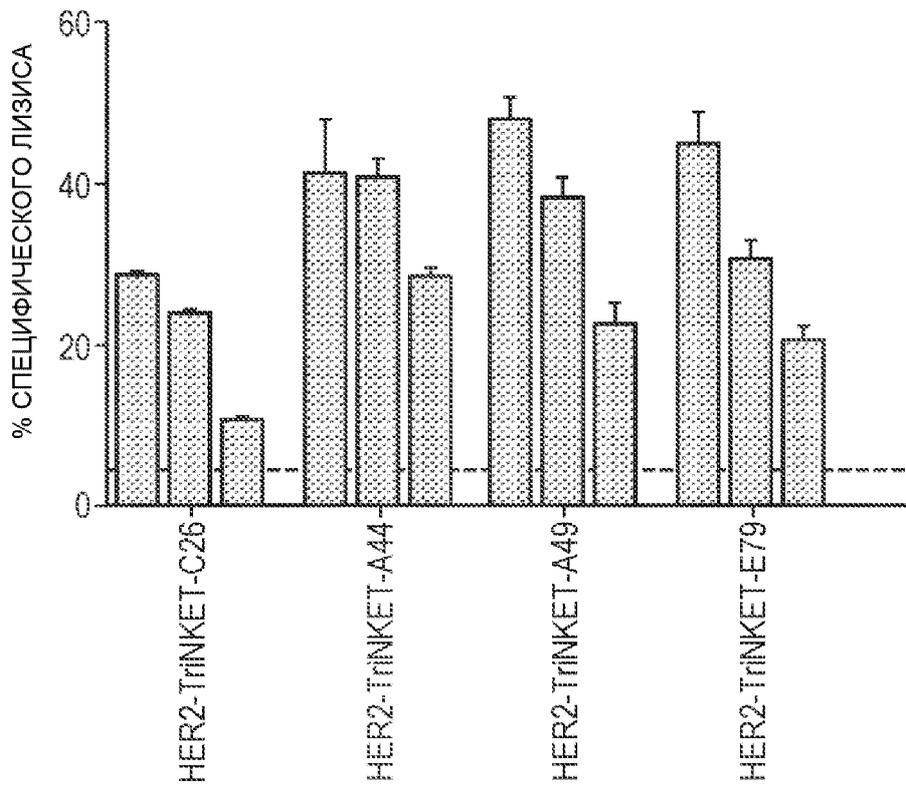
Фиг. 12



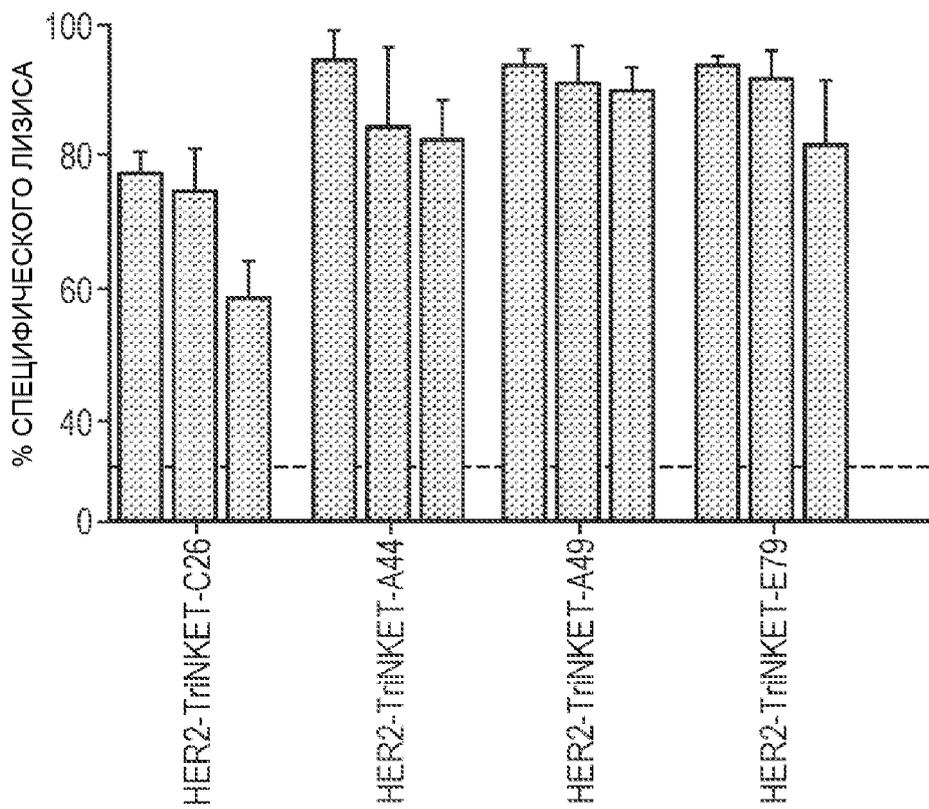
Фиг. 13



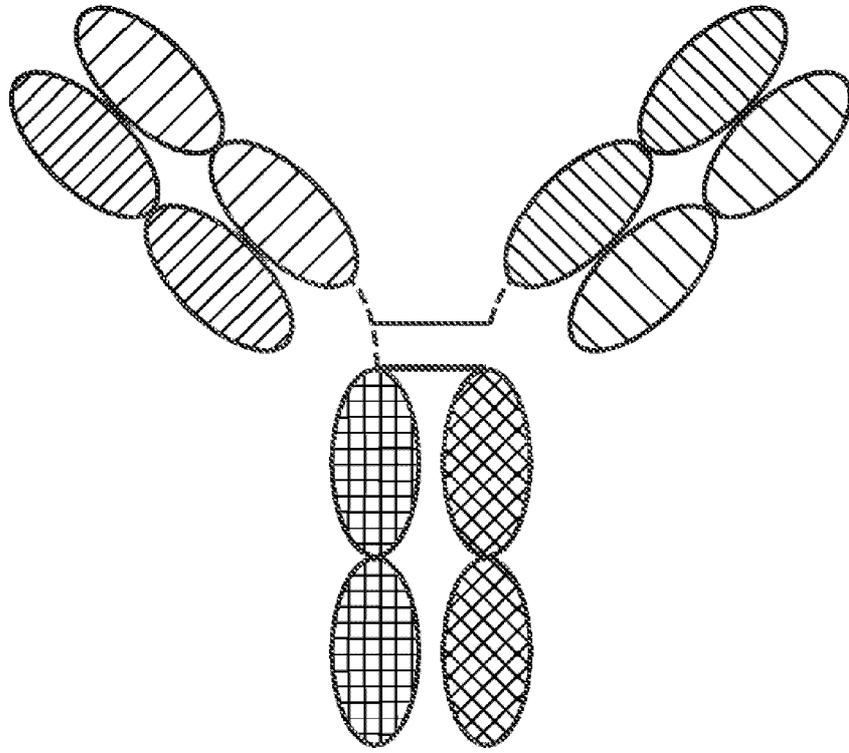
Фиг. 14



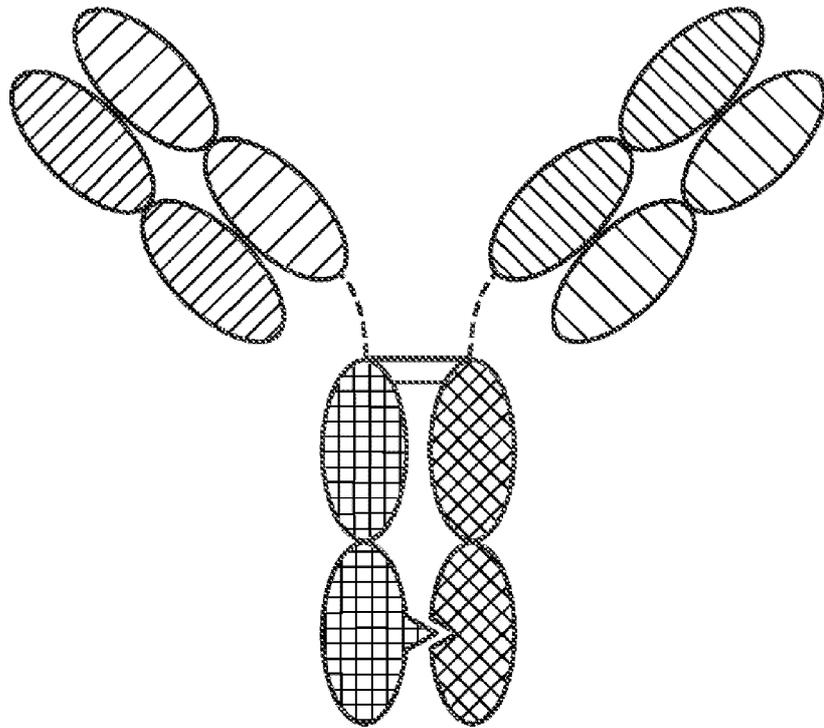
Фиг. 15



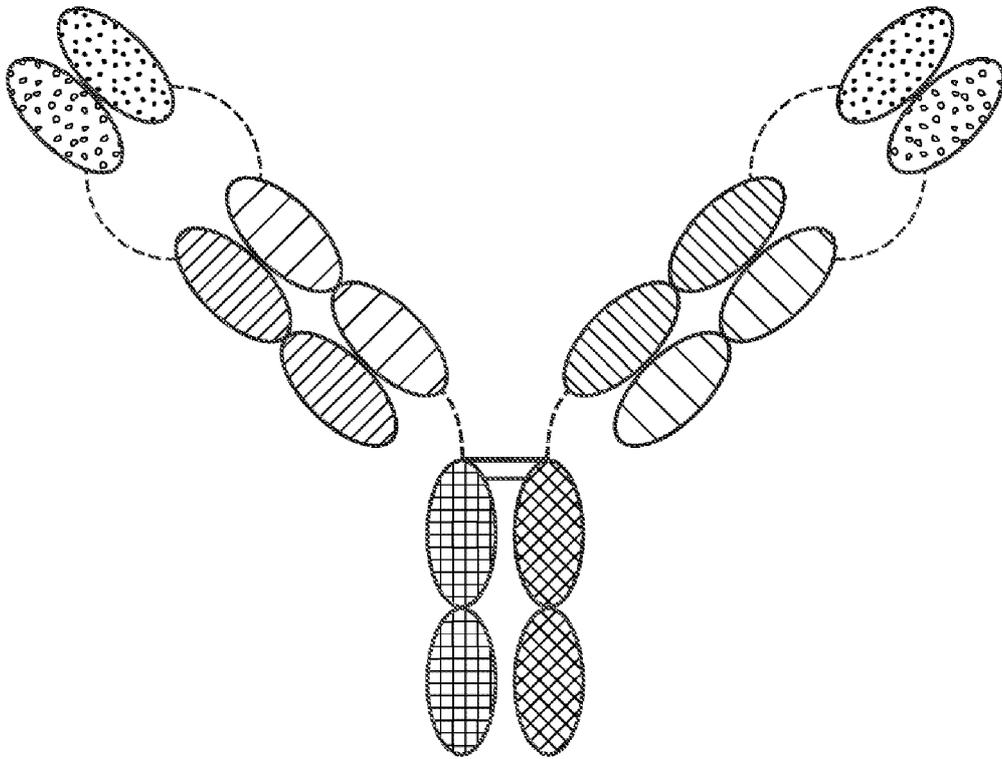
Фиг. 16



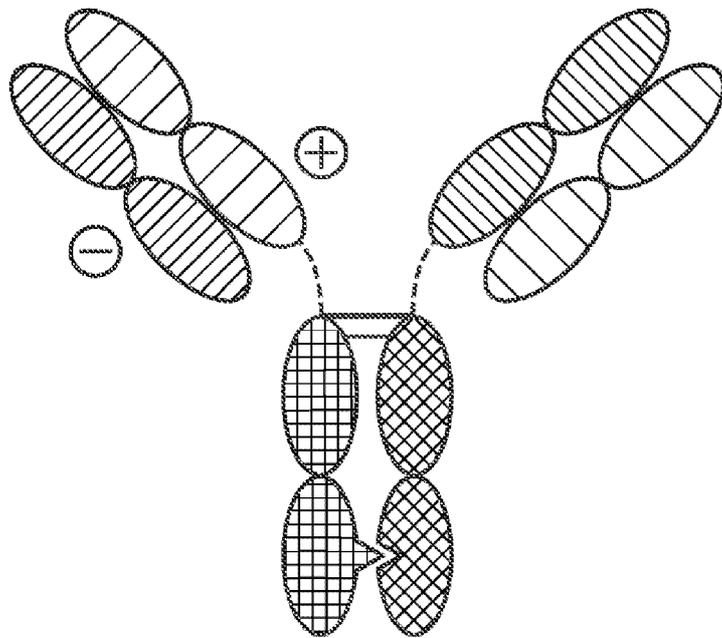
Фиг. 17



Фиг. 18

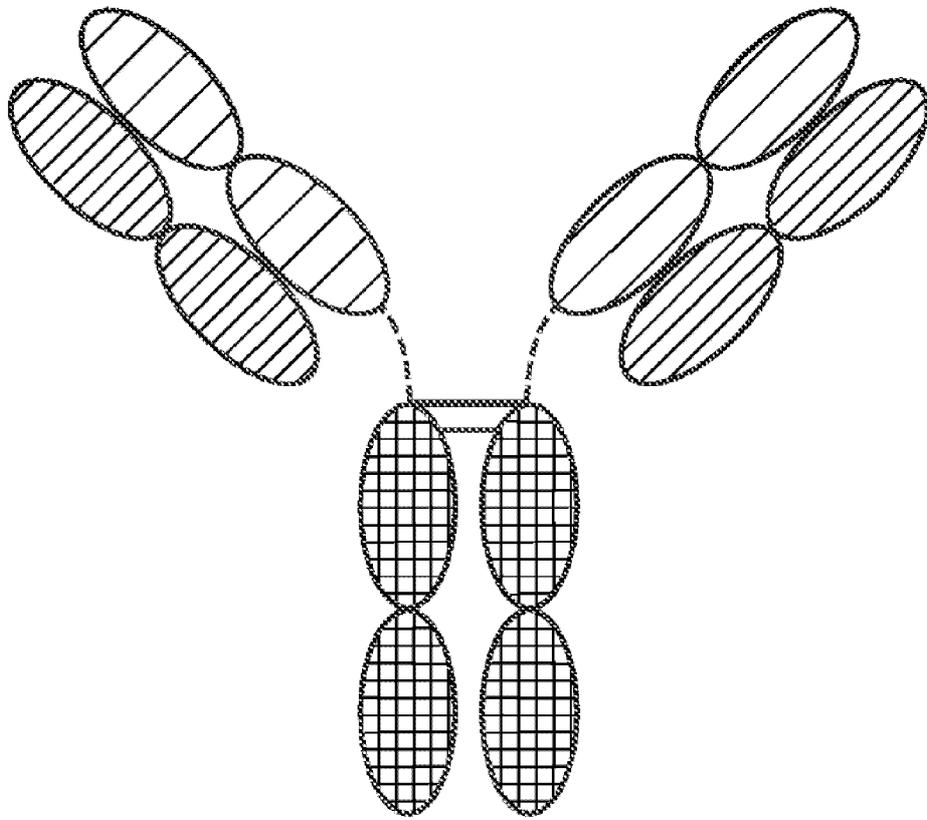


Фиг. 19

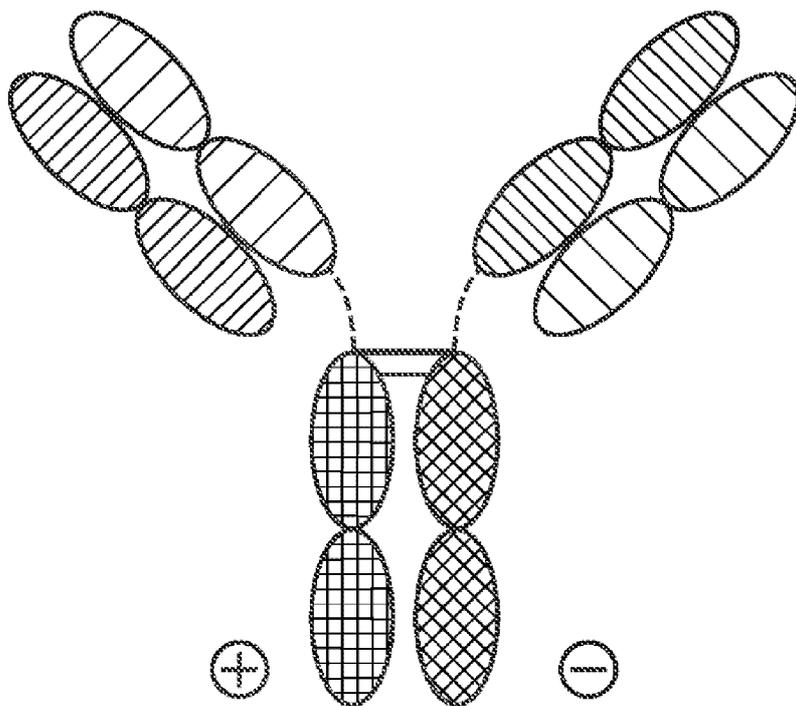


Фиг. 20

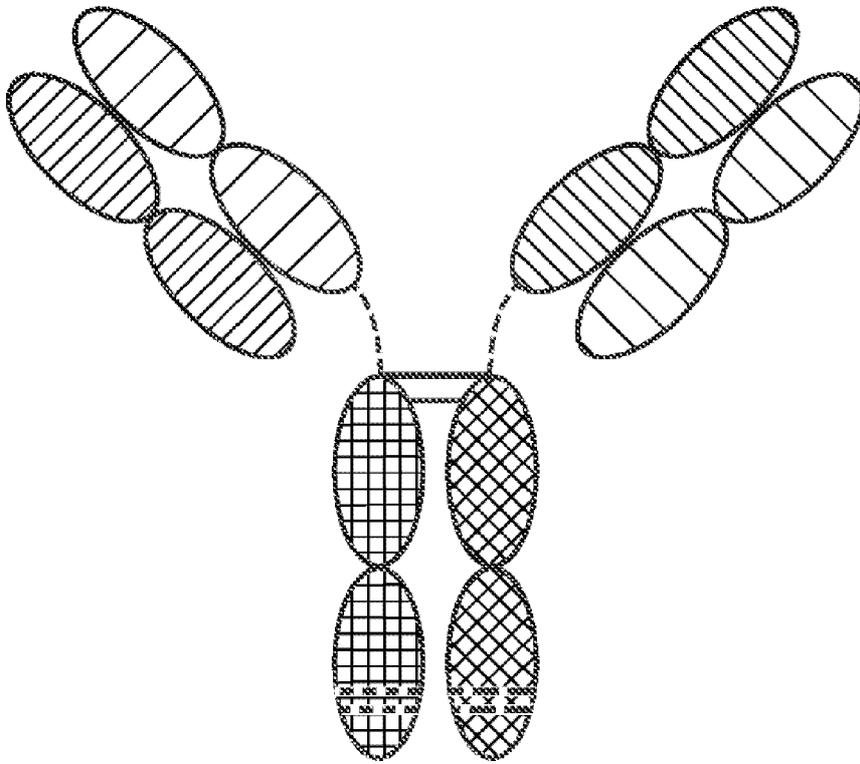
13/20



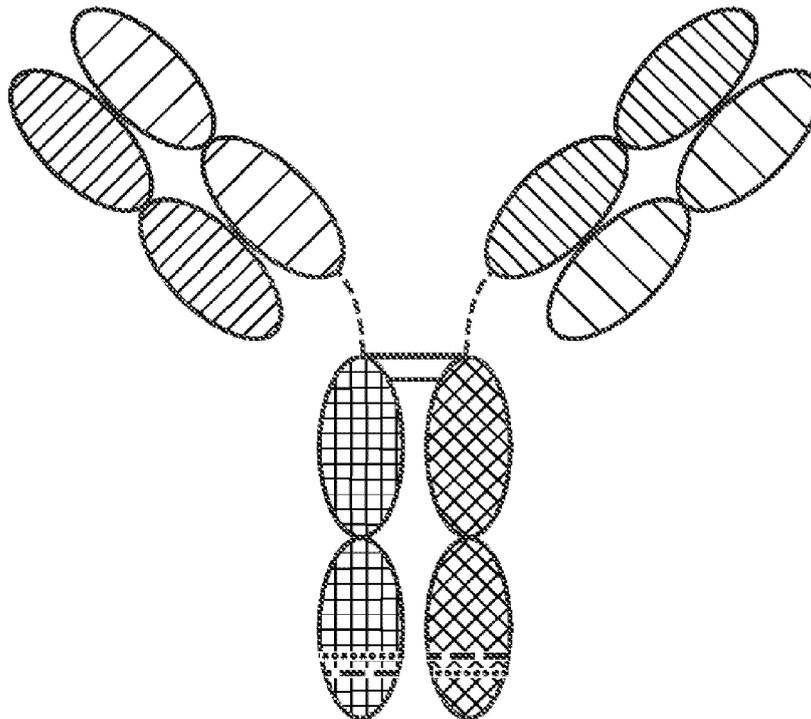
Фиг. 21



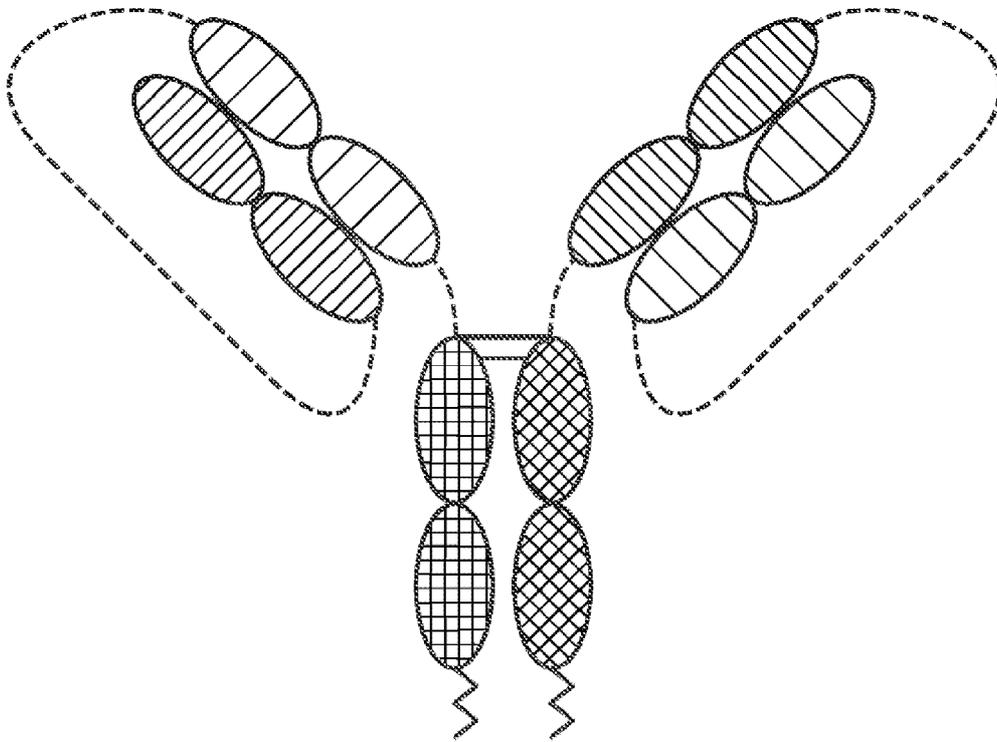
Фиг. 22



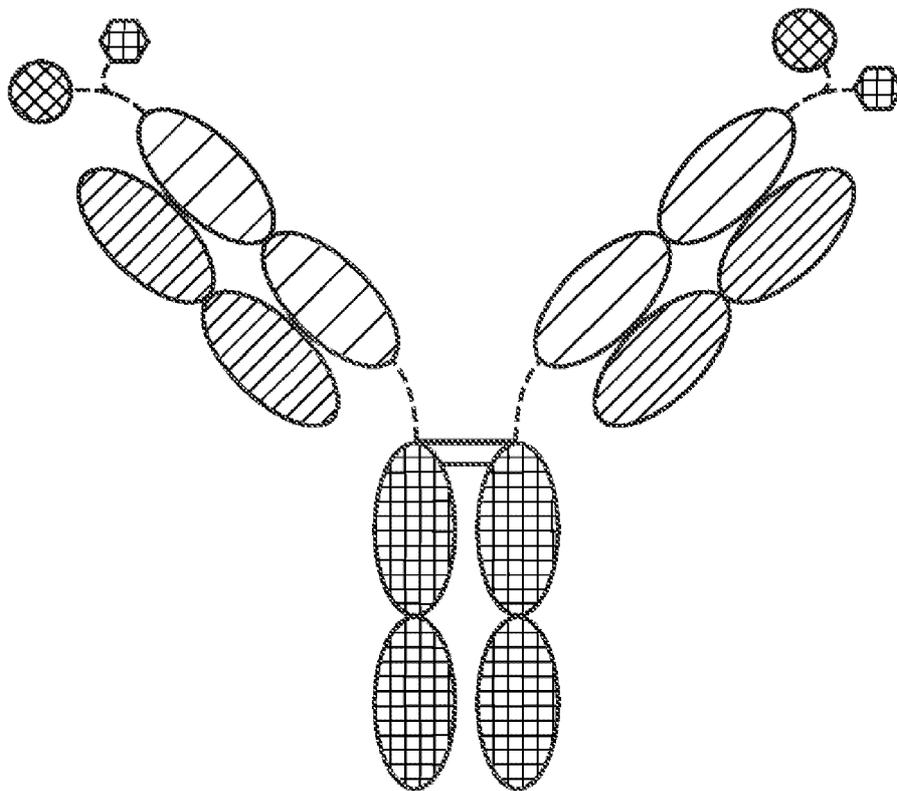
Фиг. 23



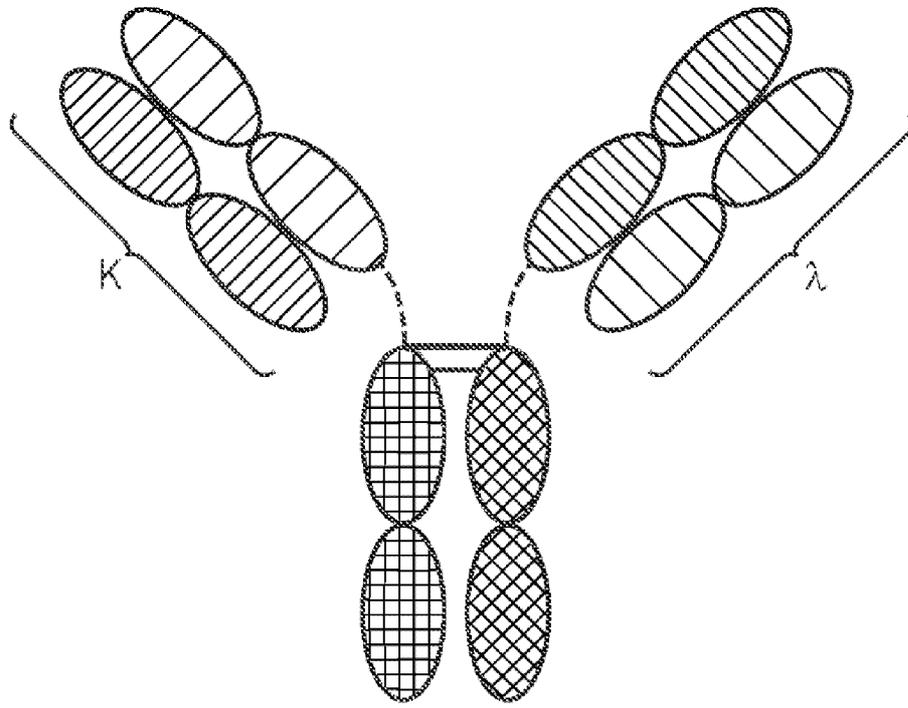
Фиг. 24



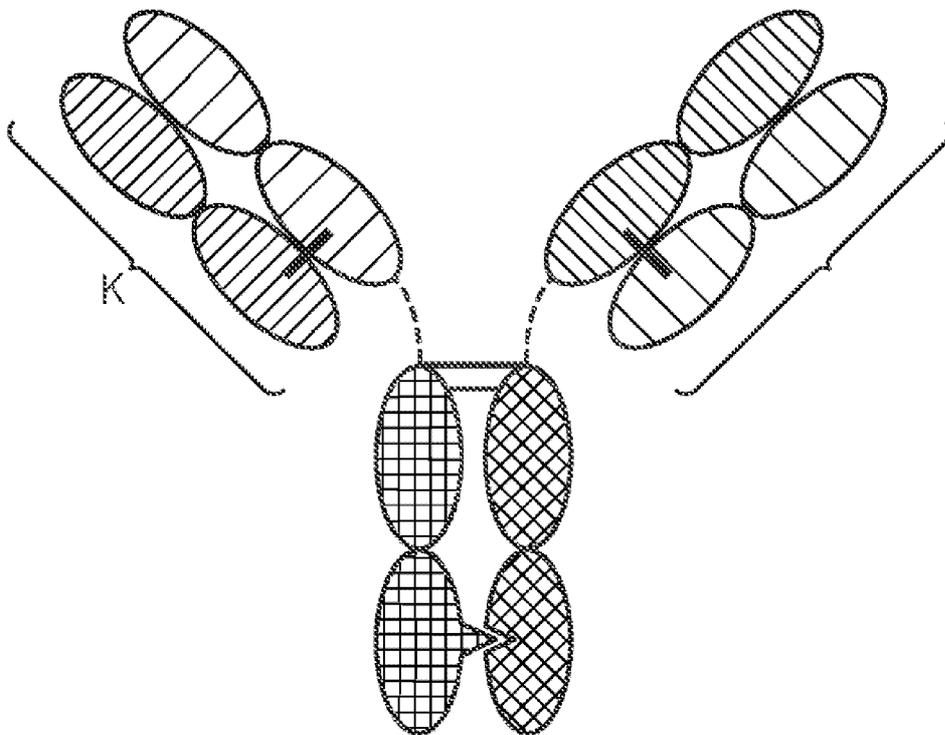
Фиг. 25



Фиг. 26

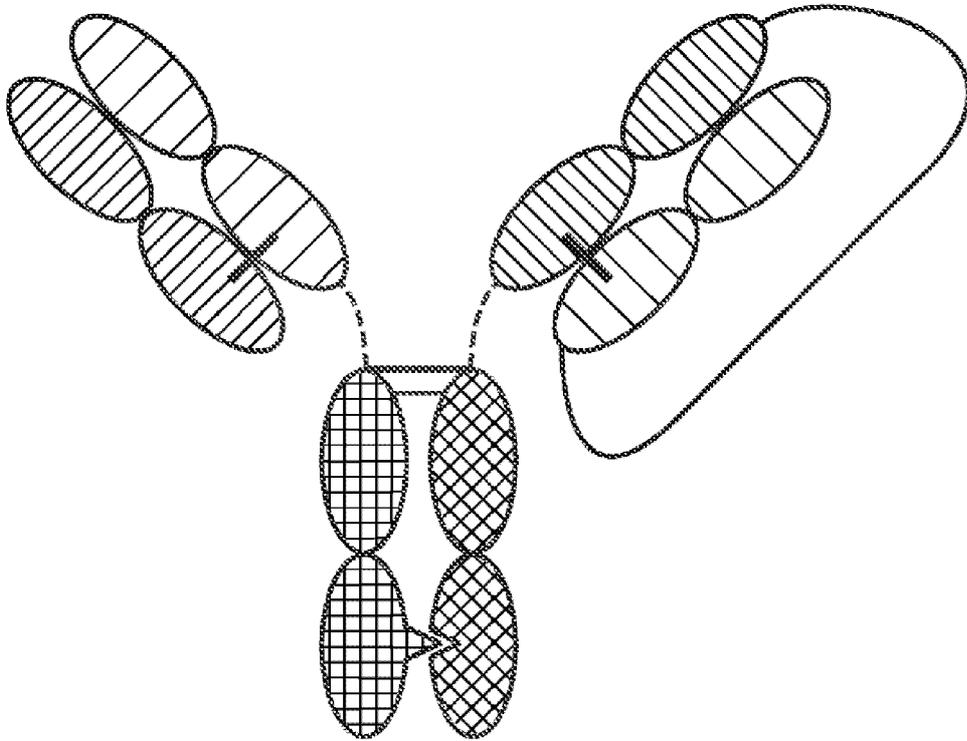


Фиг. 27А

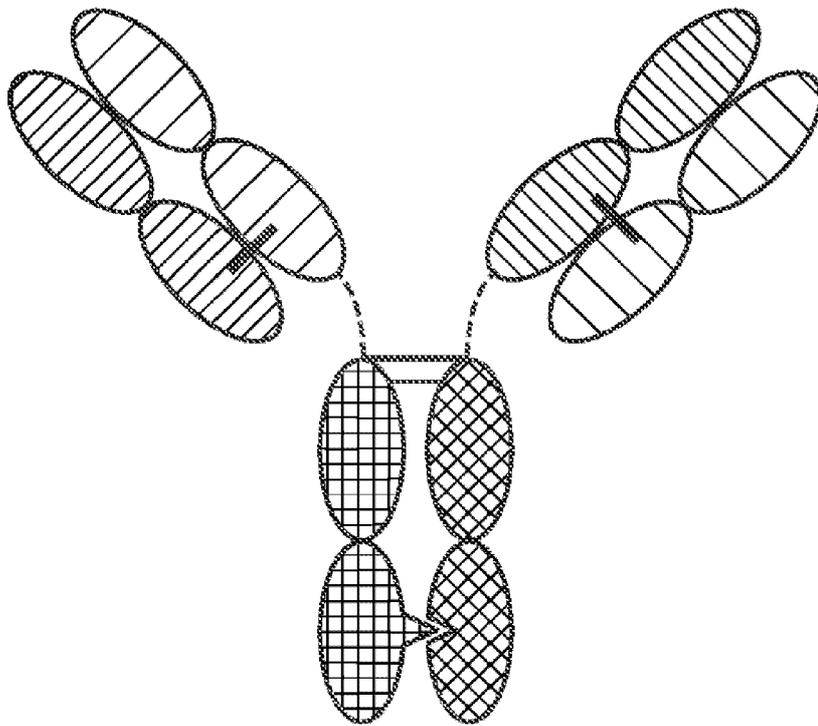


Фиг. 27В

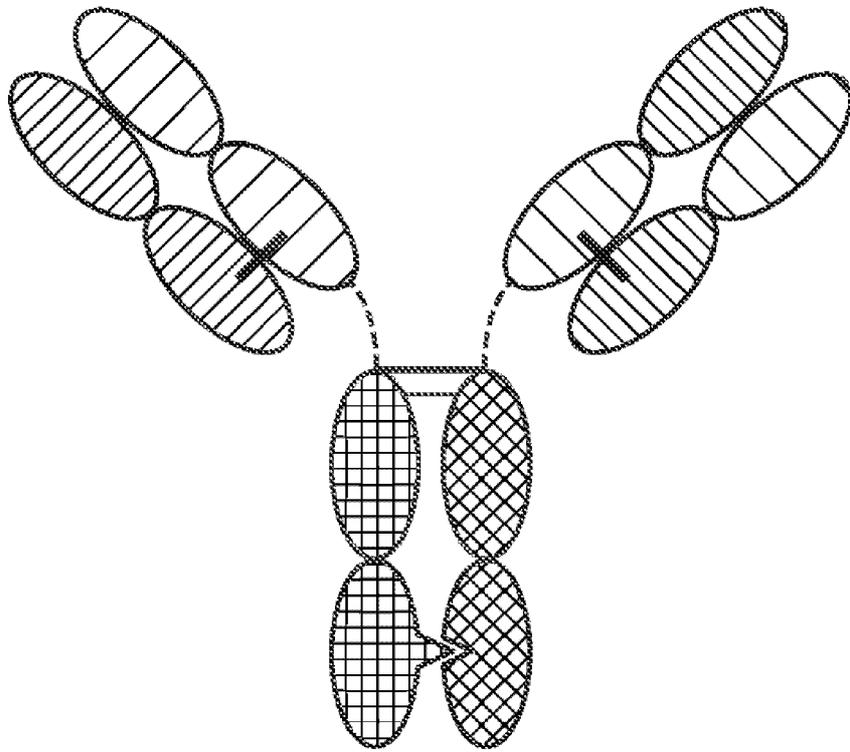
17/20



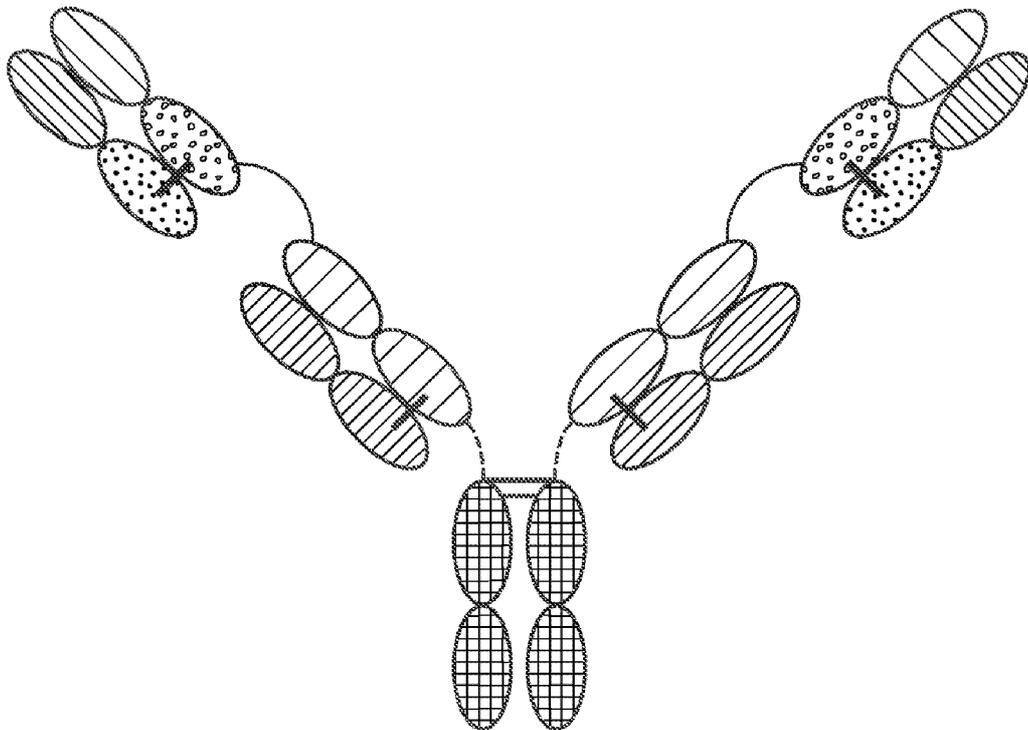
Фиг. 28



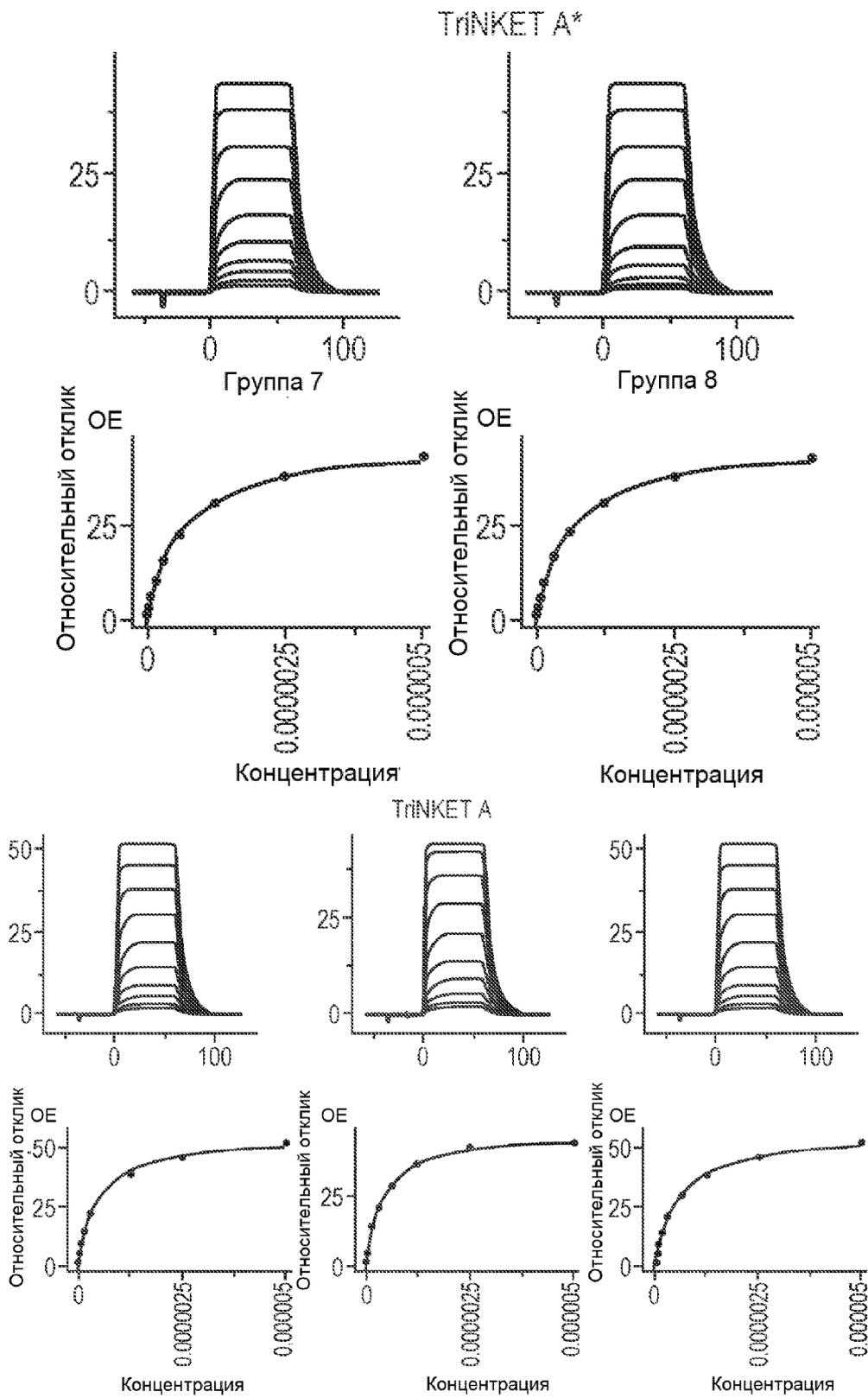
Фиг. 29



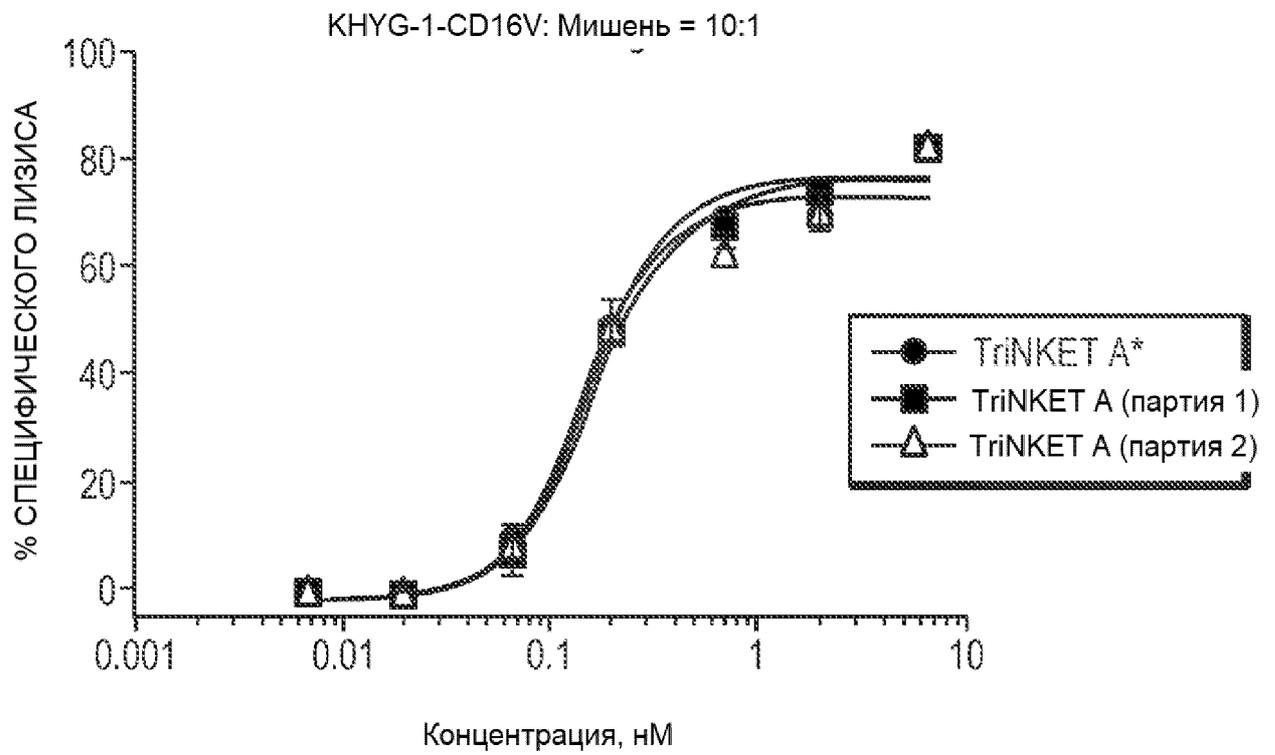
Фиг. 30



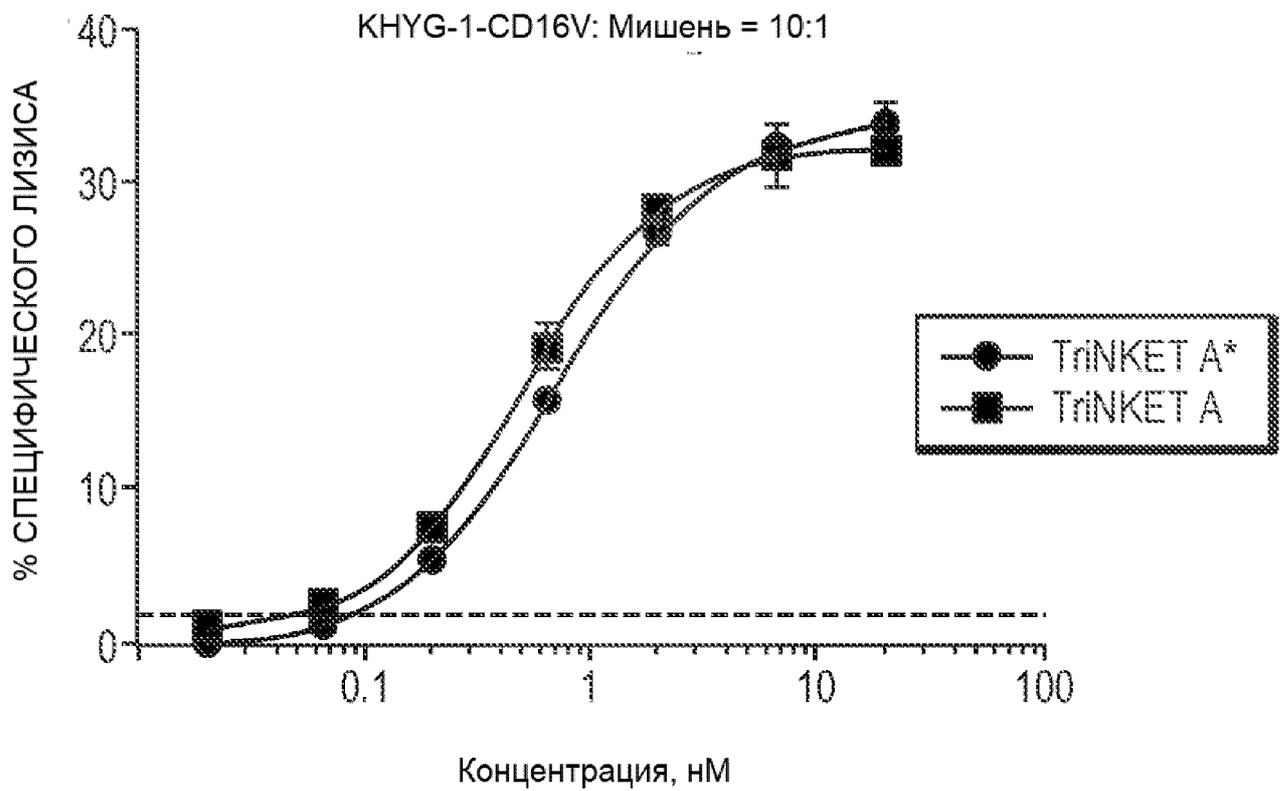
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34