

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190453** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.06.10

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.07

(54) **ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С HER2, NKG2D И CD16, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/716,259

(32) 2018.08.08

(33) US

(86) PCT/US2019/045561

(87) WO 2020/033587 2020.02.13

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

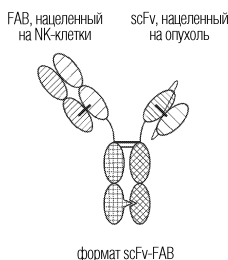
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны полиспецифические связывающие белки, которые связываются с опухолевыми клетками человека, экспрессирующими рецептор 2 эпидермального фактора роста (HER2 или ErbB2), и уничтожают их, но не уничтожают незлокачественные здоровые клетки человека, экспрессирующие HER2, а также описаны фармацевтические композиции и терапевтические способы, пригодные для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего HER2. Изобретение также относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые инициируют уничтожение опухолевых клеток CD8⁺ Т-клетками.



A1

202190453

202190453

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567140EA/085

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С HER2, NKG2D И CD16, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестные ссылки на связанные заявки

[0001] Эта заявка испрашивает преимущество и приоритет Временной заявки на патент США № 62/716,259, поданной 8 августа 2018 г., раскрытие которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 6 августа 2019 г., называется DFY-057WO_SL.txt и имеет размер 208 511 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Изобретение относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с NKG2D, CD16 и рецептором 2 эпидермального фактора роста (HER2 или ErbB2). Эти полиспецифические связывающие белки пригодны для уничтожения опухолевых клеток человека, экспрессирующих Her2, без значительной цитотоксичности против незлокачественных здоровых клеток человека, экспрессирующих HER2.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Онкологическое заболевание продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на значительные исследовательские усилия и научные достижения для лечения этого заболевания, о которых сообщается в литературе. Некоторые из наиболее часто диагностируемых видов онкологических заболеваний включают рак предстательной железы, рак молочной железы и рак легкого. Рак предстательной железы является наиболее распространенной формой онкологических заболеваний у мужчин. Рак молочной железы остается основной причиной смерти у женщин. Существующие методы лечения этих видов онкологических заболеваний не эффективны для всех пациентов и/или могут иметь существенные побочные эффекты. Другие виды онкологических заболеваний также остаются сложными для лечения с использованием существующих методов лечения.

[0005] Противоопухолевая иммунотерапия желательна, потому что она высокоспецифична и может способствовать разрушению опухолевых клеток с использованием собственной иммунной системы пациента. Слитые белки, такие как биспецифические белки, рекрутирующие Т-клетки, представляют собой противоопухолевые иммунотерапевтические средства, описанные в литературе, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. Антитела, которые связываются с определенными опухолеассоциированными антигенами и с определенными иммунными клетками,

описаны в литературе. См., например., WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

[0006] Клетки-натуральные киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют приблизительно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки проникают практически во все ткани, и первоначально характеризовались своей способностью эффективно уничтожать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсibilизации. Активированные NK-клетки уничтожают клетки-мишени с помощью средств, аналогичных цитотоксическим Т-клеткам, то есть с помощью цитолитических гранул, которые содержат перфорин и гранзимы, а также посредством путей рецепторов клеточной смерти. Активированные NK-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN- γ и хемокины, которые способствуют рекрутированию других лейкоцитов в ткани-мишени.

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

[0008] HER2 (ErbB2) представляет собой трансмембранный гликопротеин, который принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста. Это рецепторная тирозинкиназа, регулирующая выживание, пролиферацию и рост клеток. HER2 играет важную роль в злокачественных новообразованиях человека. Ген ERBB2 амплифицируется или сверхэкспрессируется примерно в 30% случаев рака молочной железы человека. Пациенты с раком молочной железы со сверхэкспрессией HER2 имеют значительно более низкие показатели общей выживаемости и более короткие интервалы без признаков заболевания, чем пациенты, у которых злокачественное новообразование не сверхэкспрессирует HER2. Более того, сверхэкспрессия HER2 приводит к увеличению метастазов рака молочной железы. Сверхэкспрессия HER2 также известна при многих других типах онкологических заболеваний, включая рак молочной железы, яичников, пищевода, мочевого пузыря и желудка, карциному слюнных протоков, аденокарциному легких и агрессивные формы рака матки, такие как серозная карцинома эндометрия матки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Изобретение относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с опухолевыми клетками человека, экспрессирующими рецептор 2 эпидермального фактора роста (HER2 или ErbB2), и уничтожают их. Изобретение относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с HER2 на опухолевой клетке и с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на клетках-натуральных киллерах. Такие белки могут рекрутировать более чем один тип рецепторов,

активирующих NK, и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белок может быть агонистом NK-клеток у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. В некоторых вариантах осуществления белок может стимулировать Т-клеток у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки. Различные аспекты и варианты осуществления изобретения описаны более подробно ниже.

[0010] В одном аспекте настоящее изобретение относится к белку (например, полиспецифическому связывающему белку), содержащему: (a) первый антигенсвязывающий сайт, содержащий Fab-фрагмент, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который связывается с HER2; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывается с CD16.

[0011] В некоторых вариантах осуществления scFv связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16, через шарнир, содержащий Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления scFv связан с Fc-доменом антитела.

[0012] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи scFv. В некоторых вариантах осуществления дисульфидный мостик образуется между C44 переменного домена тяжелой цепи и C100 переменного домена легкой цепи.

[0013] В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи scFv связан с переменным доменом тяжелой цепи scFv через гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143. В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи расположен на N-конце или C-конце переменного домена тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи расположен на N-конце переменного домена тяжелой цепи.

[0014] В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16.

[0015] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности области 1, определяющей комплементарность, (CDR1), области 2, определяющей комплементарность, (CDR2) и области 3, определяющей комплементарность, (CDR3), представленные аминокислотными последовательностями

SEQ ID NO: 168, 96 и 169, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 95, 96 и 97, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно.

[0016] В некоторых вариантах осуществления белок по настоящему изобретению, содержащий первый связывающий антиген, который связывается с NKG2D, содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности области 1, определяющей комплементарность, (CDR1), области 2, определяющей комплементарность, (CDR2) и области 3, определяющей комплементарность, (CDR3), представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 169, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно;

(b) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 173, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно;

(c) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 95, 96 и 97, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно;

(d) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 166, 88 и 167, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 91, 92 и 93, соответственно;

(e) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 162, 72 и 170, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 107, 108 и 109, соответственно;

(f) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:

(b) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 123, 124 и 125, соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 127, 128 и 129, соответственно; или

(c) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 131, 132 и 133, соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно.

[0017] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 94, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 97 или 169) SEQ ID NO: 94. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0018] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 144, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 144, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 172 или 173) SEQ ID NO: 144. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0019] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 174, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять

по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 174, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 175 или 176) SEQ ID NO: 174. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0020] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 177, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 177, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 178 или 179) SEQ ID NO: 177. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0021] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 180, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 180, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 181 или 182) SEQ ID NO: 180. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0022] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 183, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 183, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 184 или 185) SEQ ID NO: 183. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0023] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 186, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 186, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или 168), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 187 или 188) SEQ ID NO: 186. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 98, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) SEQ ID NO: 98.

[0024] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 90. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 86, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 87 или 166), CDR2 (SEQ ID NO: 88) и CDR3 (SEQ ID NO: 89 или 167) SEQ ID NO: 86. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 90, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 91), CDR2 (SEQ ID NO: 92) и CDR3 (SEQ ID NO: 93) SEQ ID NO: 90.

[0025] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 102, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 106. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 102, и/или включает аминокислотные

последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 71 или 162), CDR2 (SEQ ID NO: 72) и CDR3 (SEQ ID NO: 105 или 170) SEQ ID NO: 102. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 106, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 107), CDR2 (SEQ ID NO: 108) и CDR3 (SEQ ID NO: 109) SEQ ID NO: 106.

[0026] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 70, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 74. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 70, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 71 или 162), CDR2 (SEQ ID NO: 72) и CDR3 (SEQ ID NO: 73 или 163) SEQ ID NO: 70. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 74, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 75), CDR2 (SEQ ID NO: 76) и CDR3 (SEQ ID NO: 77) SEQ ID NO: 74.

[0027] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 70, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 74. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 70, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 71 или 162), CDR2 (SEQ ID NO: 72) и CDR3 (SEQ ID NO: 73 или 163) SEQ ID NO: 70. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 74, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 75), CDR2 (SEQ ID NO: 76) и CDR3 (SEQ ID NO: 77) SEQ ID NO: 74.

[0028] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 78, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 82. Например, переменный домен тяжелой цепи первого антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 78, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 79 или 164),

CDR2 (SEQ ID NO: 80) и CDR3 (SEQ ID NO: 81 или 165) SEQ ID NO: 78. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 82, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 75), CDR2 (SEQ ID NO: 76) и CDR3 (SEQ ID NO: 77) SEQ ID NO: 82.

[0029] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт связывается с NKG2D с KD от 2 до 120 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с NKG2D с KD от 2 нМ до 120 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[0030] В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 195, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 196. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 195, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 115), CDR2 (SEQ ID NO: 116) и CDR3 (SEQ ID NO: 117) SEQ ID NO: 195. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 196, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 119), CDR2 (SEQ ID NO: 120) и CDR3 (SEQ ID NO: 121) SEQ ID NO: 196. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт связывания с HER2 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

[0031] Альтернативно, второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 197, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 198. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 197, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 123), CDR2 (SEQ ID NO: 124) и CDR3 (SEQ ID NO: 125) SEQ ID NO: 197. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 198, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 127), CDR2 (SEQ ID NO: 128) и CDR3 (SEQ ID NO: 129) SEQ ID NO: 198. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит scFv, содержащий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

[0032] Альтернативно, второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 199, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 200. Например, переменный домен тяжелой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 199, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 131), CDR2 (SEQ ID NO: 132) и CDR3 (SEQ ID NO: 133) SEQ ID NO: 199. Точно так же переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может составлять по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 200, и/или включает аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 135), CDR2 (SEQ ID NO: 136) и CDR3 (SEQ ID NO: 137) SEQ ID NO: 200. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171.

[0033] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2-домен человеческого антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1.

[0034] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену человеческого IgG1, и отличается в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, T350, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411, K439.

[0035] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены Q347R, D399V и F405T, например, в Fc-домене, связанном с scFv. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены K360E и K409W, например, в Fc-домене, связанном с Fab-фрагментом.

[0036] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела содержит Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замену T366W, например, в Fc-домене, связанном с Fab-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела включает Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены T366S, L368A и Y407V, например, в Fc-домене, связанном с scFv.

[0037] В некоторых вариантах осуществления белок содержит последовательность SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления эта последовательность представляет собой часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, связанную с Fc-доменом антитела.

[0038] В некоторых вариантах осуществления белок содержит последовательность SEQ ID NO: 140 или SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления эта последовательность представляет собой scFv, связанный с Fc-доменом антитела.

[0039] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к белку (например, полиспецифическому связывающему белку), содержащему: (a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 141; (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192; и (c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере 90% (например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 140.

[0040] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к белку (например, полиспецифическому связывающему белку), содержащему: (a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% (например, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 141; (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% (например, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192; и (c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% (например, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% (например, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 140.

[0041] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к белку (например, полиспецифическому связывающему белку), содержащему: (a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192; и (c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления белок содержит (a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; (b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; и (c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

[0042] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к композиции, содержащей белок, раскрытый в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0043] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к клетке, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих белок, описанный в настоящем документе.

[0044] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу прямого и/или косвенного усиления гибели опухолевых клеток, при этом способ включает экспонирование опухолевых клеток и клеток-натуральных киллеров с белком, раскрытым в настоящем описании.

[0045] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения онкологического заболевания, который включает введение белка или композиции, раскрытой в настоящем описании, пациенту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, почечно-клеточной карциномы, аденокарциномы легкого, рака предстательной железы, холангиокарциномы, рака матки, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака легкого, мезотелиомы, рака печени, мезотелиомы, саркомы и рака желчного пузыря.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0046] ФИГ. 1 иллюстрирует триспецифическое антитело (TriNKET), которое содержит HER2-связывающий scFv, Fab, нацеленный на NKG2D, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела («домен CD»), который связывается с CD16 (формат scFv-Fab). В иллюстративном варианте осуществления Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, содержит мутации K360E и K409W, а Fc-домен, связанный с scFv, содержит совпадающие мутации Q347R, D399V и F405T для образования гетеродимера Fc (показан в виде треугольного формата «ключ-замок» в доменах Fc на ФИГ. 1). Формат антитела обозначается в настоящем описании как F3'-TriNKET. В другом иллюстративном варианте осуществления Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, содержит мутации Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с scFv, содержит соответствующие мутации K360E и K409W для образования гетеродимера.

[0047] ФИГ. 2 представляет собой TriNKET «выступ во впадине» (KiH), который включает scFv, который связывается с HER2, связанный с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser, и Fab-фрагмент, связывающий NKG2D, включая (a) часть тяжелой цепи, содержащую переменный домен тяжелой цепи и домен CH1, связанный с Fc-доменом, и (b) часть легкой цепи, содержащую переменный домен легкой цепи и домен CL. В иллюстративном варианте осуществления Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, содержит мутацию «выступа» T366W, а Fc-домен, связанный с scFv, содержит соответствующие мутации «впадины» T366S, L368A, Y407V (показаны в виде треугольного формата «ключ-замок» в Fc-доменах на ФИГ. 2). В иллюстративном варианте осуществления Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, содержит мутации «выступа» T366S, L368A, Y407V, а Fc-домен, связанный с scFv, содержит мутацию «впадины» T366W.

[0048] ФИГ. 3 представляет собой линейные графики, демонстрирующие, что TriNKET, нацеленные на HER2, более эффективны, чем трастузумаб, в отношении HER2+ клеточной линии (низкий уровень).

[0049] ФИГ. 4 представляет собой линейные графики, демонстрирующие, что TriNKET, нацеленные на HER2, более эффективны, чем трастузумаб, в отношении HER2++ клеточной линии.

[0050] ФИГ. 5 представляет собой линейные графики, демонстрирующие, что TriNKET, нацеленные на HER2, более эффективны, чем трастузумаб, в отношении HER2+++ клеточной линии.

[0051] ФИГ. 6 демонстрирует, что TriNKET, нацеленные на HER2, превосходят трастузумаб в долгосрочном анализе уничтожения.

[0052] ФИГ. 7 демонстрирует, что TriNKET, нацеленные на HER2, превосходят трастузумаб в долгосрочном анализе уничтожения.

[0053] ФИГ. 8A-8F представляют собой FACS, показывающие, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с иммунными клетками в крови человека. ФИГ. 8A демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с NK-клетками в крови человека; 8B демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с CD8+ Т-клетками; ФИГ. 8C демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с CD4+ Т-клетками; ФИГ. 8D демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с В-клетками; ФИГ. 8E демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с моноцитами; и ФИГ. 8F демонстрирует, что нацеленные на HER2 TriNKET демонстрируют минимальное связывание с гранулоцитами (пунктирная линия - вторичный контроль; штриховая линия - трастузумаб; сплошная линия - HER2-F3'-TriNKET-A49).

[0054] ФИГ. 9 представляет собой линейные графики, демонстрирующие связывание A49-F3'-TriNKET-трастузумаб с кардиомиоцитами человека, опухолевыми клетками SKBR3, H661 и 786-О.

[0055] ФИГ. 10A демонстрирует опосредованное A49-F3'-TriNKET-трастузумаб уничтожение с помощью РВМС человека опухолевых клеток SKBR3 после 3 дней совместного культивирования при соотношении РВМС и клеток-мишеней (Е:Т) 1:1.

[0056] ФИГ. 10B демонстрирует, что A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб не убивает незлокачественные здоровые кардиомиоциты даже после 3 дней совместного культивирования при соотношении РВМС и клеток-мишеней (Е:Т) 1:1.

[0057] ФИГ.11A демонстрирует опосредованное A49-F3'-TriNKET-трастузумаб уничтожение человеческими РВМС опухолевых клеток SKBR3 после 3 дней совместного культивирования при соотношении РВМС и клеток-мишеней (Е:Т) 20:1.

[0058] ФИГ. 11B демонстрирует, что A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб не убивает незлокачественные здоровые кардиомиоциты даже после 3 дней совместного

культивирования при соотношении РВМС и клеток-мишеней (Е:Т) 20:1.

[0059] ФИГ. 12А-12В демонстрируют, что CD8⁺ Т-клетки, созданные при стимуляции соnА и культивированные с IL-15, имели высокую чистоту (99% клеток CD3⁺CD8⁺) (ФИГ. 12А) и все экспрессировали NKG2D (ФИГ. 12В), но не CD16 (ФИГ. 12С).

[0060] ФИГ. 13А-13В представляют собой графики, показывающие цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток в присутствии А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб после культивирования с IL-15. ФИГ. 13А демонстрирует усиленное уничтожение опухолевых клеток SkBr-3 в краткосрочных совместных культурах под действием А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб. Нацеленные на HER2 А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб запускают дозозависимый лизис клеток-мишеней SkBr-3 с помощью стимулированных IL-15 CD8⁺ Т-клеток. ФИГ. 13В демонстрирует, что 67 нМ TriNKET, нацеленные на HER2, запускают лизис клеток-мишеней SkBr-3 стимулированными IL-2 CD8⁺ Т-клетками. Пунктирная линия указывает на эффект только при совместном культивировании CD8⁺ Т-клеток с опухолевыми клетками SkBr-3 (без обработки).

[0061] ФИГ. 14А демонстрирует уровни роста в процентах клеток SkBr-3, культивируемых отдельно, совместно культивируемых с CD8⁺ Т-клетками, совместно культивируемых с CD8⁺ Т-клетками и с А49- $F3'$ -TriNKET-трастузумаб, каждые в присутствии антитела против CD3.

[0062] ФИГ. 14В демонстрирует уровень роста в процентах клеток SkBr-3, культивируемых отдельно, совместно культивируемых с CD8⁺ Т-клетками, совместно культивируемых с CD8⁺ Т-клетками и А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб, каждые в отсутствие антитела против CD3.

[0063] ФИГ. 15А-15В демонстрируют связывание TriNKET с клеточной линией SkBr-3, которая имеет высокий уровень экспрессии HER2 по данным проточной цитометрии клеток SkBr-3, инкубированных с серией концентраций TriNKET или трастузумаба и вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором. ФИГ. 15А демонстрирует уровень связывания в виде процентных значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) относительно максимального MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными с 670 нМ TriNKET. ФИГ. 15В демонстрирует уровень связывания в виде кратного превышения относительно фоновых значений MFI (FOB) по сравнению с фоновым MFI, наблюдаемым на клетках, инкубированных только с вторичным антителом.

[0064] ФИГ. 16А-16В демонстрируют связывание TriNKET с клеточной линией NCI-H661, которая имеет умеренный уровень экспрессии HER2, как измерено с помощью проточной цитометрии клеток NCI-H661, инкубированных с серией концентраций TriNKET или трастузумаба и вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором. ФИГ. 16А демонстрирует уровень связывания в виде процентных значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) относительно максимального MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными с 670 нМ TriNKET. ФИГ. 16В демонстрирует уровень связывания в виде кратного превышения относительно фоновых значений MFI (FOB) по

сравнению с фоновым MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными только с вторичным антителом.

[0065] ФИГ. 17А-17В демонстрируют связывание TriNKET с клеточной линией 786-О, которая имеет низкий уровень экспрессии HER2, по данным проточной цитометрии клеток 786-О, инкубированных с серией концентраций TriNKET или трастузумаба и вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором. ФИГ. 16А демонстрирует уровень связывания в виде процентных значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) относительно максимального MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными с 670 нМ TriNKET. ФИГ. 16В демонстрирует уровень связывания в виде кратных значений MFI по сравнению с фоновым (FOB) относительно фонового MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными только с вторичным антителом.

[0066] ФИГ. 18А-18В демонстрируют связывание TriNKET, нацеленных на HER2, с hNKG2D-экспрессирующими клетками EL4, как измерено с помощью проточной цитометрии клеток EL4, инкубированных с серией концентраций TriNKET или трастузумаба и вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором. Уровни связывания показаны в виде кратного превышения фоновых значений (FOB) MFI относительно фонового MFI, что наблюдали с клетками, инкубированными только с вторичным антителом.

[0067] ФИГ. 19 демонстрирует, что TriNKET являются более мощными и эффективными по части опосредования уничтожения NK-клетками 786-О клеток-мишеней, чем комбинация Fc-молчащих TriNKET и трастузумаба.

[0068] ФИГ. 20 демонстрирует, что TriNKET являются более мощными и эффективными по части опосредования уничтожения NK-клетками клеток-мишеней H661, чем комбинация Fc-молчащего TriNKET и трастузумаба.

[0069] ФИГ. 21 представляет собой линейный график, показывающий эффективность TriNKET А и TriNKET А* (в котором M102 из A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб заменен на I) по части опосредования цитотоксичности NK-клеток против клеток-мишеней SKBR-3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0070] Изобретение относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с HER2 на опухолевой клетке и рецептором NKG2D и рецептором CD16 на клетках-натуральных киллерах, к фармацевтическим композициям, содержащим такие полиспецифические связывающие белки, и к терапевтическим способам с использованием таких полиспецифических белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения онкологического заболевания. Различные аспекты изобретения изложены ниже в разделах; однако аспекты изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны быть ограничены каким-либо конкретным разделом.

[0071] Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, ряд терминов и выражений определены ниже.

[0072] Термин в единственном числе, используемый в настоящем описании,

означает «один или более» и включают множественное число, если контекст не является неподходящим.

[0073] Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий сайт» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В человеческих антителах антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых переменных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно 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 присутствуют между гиперпеременными областями иммуноглобулинов и рядом с ними. В молекуле человеческого антитела три гиперпеременные области легкой цепи и три гиперпеременные области тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, и три гиперпеременные области каждой из тяжелой и легкой цепей называются «областями, определяющими комплементарность», или «CDR». У некоторых животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий сайт образован одной цепью антитела, обеспечивая «однодоменное антитело». Антигенсвязывающие сайты 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. Все положения аминокислот в переменных областях тяжелой или легкой цепи, описанные в настоящем документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией Kabat.

[0074] Термин «опухолеассоциированный антиген» в контексте настоящего описания означает любой антиген, включая, помимо прочего, белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод или липид, который ассоциирован с опухолью. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, таком как кровеносные сосуды, связанные с опухолью, внеклеточный матрикс, мезенхимальная строма или иммунные инфильтраты.

[0075] CDR антигенсвязывающего сайта можно определить методами, описанными в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996). CDR, определенные в соответствии с этими определениями, обычно включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. В некоторых вариантах осуществления термин «CDR» представляет собой CDR, как определено MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) и Martin A., Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable

Domains, in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В некоторых вариантах осуществления термин «CDR» представляет собой CDR, как определено Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991). В некоторых вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи антитела определены с использованием различных условных обозначений. Например, в некоторых вариантах осуществления CDR тяжелой цепи определены в соответствии с MacCallum (см. Выше), а CDR легкой цепи определены в соответствии с Kabat (см. Выше). CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[0076] Используемые в настоящем описании термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению способами и композициями, описанными в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и тому подобное) и, более предпочтительно, включают человека.

[0077] Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» 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. Используемый в настоящем описании термин «лечение» включает любой эффект, например облегчение, уменьшение, модуляцию, улучшение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и тому подобного или облегчению их симптомов.

[0078] Используемый в настоящем описании термин «фармацевтическая композиция» 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*.

[0079] Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-буферный солевой раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в *Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[0080] Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислоты или основания) соединения по настоящему изобретению, которая при введении пациенту способна обеспечить соединение по настоящему изобретению или активный

метаболит или его остаток. Как известно специалистам в данной области техники, «соли» соединений по настоящему изобретению могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, но не ограничиваются ими, соляную, бромводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-п-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и тому подобное. Другие кислоты, такие как щавелевая кислота, хотя сами по себе они не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы при получении солей, полезных в качестве промежуточных соединений при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

[0081] Примеры оснований включают, но не ограничиваются ими, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы NW_4^+ , где W представляет собой C_{1-4} алкил и тому подобное.

[0082] Примеры солей включают, но не ограничиваются ими: ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флукогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканоеат и тому подобное. Другие примеры солей включают анионы соединений по настоящему изобретению, соединенные с подходящим катионом, таким как Na^+ , NH_4^+ и NW_4^+ (где W представляет собой C_{1-4} алкильную группу), и тому подобное.

[0083] Для терапевтического применения соли соединений по настоящему изобретению рассматриваются как фармацевтически приемлемые. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

[0084] 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 дополнительно существуют композиции по настоящему изобретению, которые состоят по существу или состоят из перечисленных компонентов и что существуют процессы и способы согласно настоящему изобретению, которые состоят по существу или состоят из перечисленных стадий обработки.

[0085] Как правило, если в композиции указан процент, то это процент по массе, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то

предыдущее определение переменной является приоритетным.

Белки

[0086] Изобретение относится к полиспецифическим связывающим белкам, которые связываются с HER2 на опухолевой клетке и с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на клетках-натуральных киллерах, чтобы активировать клетку-натуральный киллер. Полиспецифические связывающие белки пригодны в фармацевтических композициях и терапевтических способах, описанных в настоящем документе. Связывание полиспецифического связывающего белка с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на клетке-натуральном киллере усиливает активность клетки-натурального киллера в отношении разрушения опухолевой клетки. Связывание полиспецифического связывающего белка с HER2 на опухолевой клетке приводит к тому, что опухолевая клетка приближается к клетке-натуральному киллеру, что облегчает прямое и косвенное разрушение опухолевой клетки клеткой-натуральным киллером. Дальнейшее описание примеров полиспецифических связывающих белков приведено ниже.

[0087] Первый компонент полиспецифических связывающих белков связывается с клетками, экспрессирующими рецептор NKG2D, которые могут включать, но не ограничиваются ими, NK-клетки, NKT-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки и CD8+ $\alpha\beta$ T-клетки. При связывании NKG2D полиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D и активации NK-клеток.

[0088] Второй компонент полиспецифических связывающих белков связывается с HER2-экспрессирующими клетками, которые могут включать, но не ограничиваются ими, клетки рака молочной железы, рака яичников, рака пищевода, рака мочевого пузыря и рака желудка, карциномы слюнных протоков, аденокарциномы легких и агрессивных форм рака матки, таких как серозная карцинома эндометрия матки.

[0089] Третий компонент для полиспецифических связывающих белков связывается с клетками, экспрессирующими CD16, Fc-рецептор на поверхности лейкоцитов, включая клетки-натуральные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

[0090] Описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки могут принимать различные форматы. Например, один формат включает гетеродимерное, полиспецифическое антитело, включающее первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина (ФИГ.1). Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый через линкер или шарнир антитела с Fab-фрагментом, состоящим из части тяжелой цепи, содержащей переменный домен тяжелой цепи и домен CH1 тяжелой цепи, и части легкой цепи, содержащей переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи (CL), причем части тяжелой цепи и легкой цепи Fab-фрагмента спариваются и связываются с NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc-домен (шарнир-CH2-CH3), слитый через линкер или шарнир антитела с

одноцепочечным переменным фрагментом (scFv), состоящим из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, которые спариваются и связываются с антигеном HER2.

[0091] В некоторых вариантах осуществления описанный выше одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. Шарнирная последовательность может обеспечивать гибкость связывания с антигеном-мишенью и баланс между гибкостью и оптимальной геометрией.

[0092] В некоторых вариантах осуществления описанный выше одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи для повышения стабильности scFv. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 переменного домена тяжелой цепи и остатком C100 переменного домена легкой цепи, положения аминокислот пронумерованы согласно Kabat. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер. Может использоваться любой подходящий линкер, например линкер (G4S)₄ (SEQ ID NO: 203). В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на N-конце переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на C-конце переменного домена легкой цепи.

[0093] Описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки могут дополнительно включать один или более дополнительных антигенсвязывающих сайтов. Дополнительный антигенсвязывающий сайт (сайты) может быть слит с C-концом домена CH₂ константной области или с C-концом домена CH₃ константной области, необязательно через линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий сайт (сайты) принимает форму одноцепочечной переменной области (scFv), которая необязательно стабилизирована дисульфидом, что приводит к четырехвалентному или трехвалентному полиспецифическому связывающему белку. Например, полиспецифический связывающий белок включает сайт связывания NKG2D, сайт связывания HER2, третий антигенсвязывающий сайт, который связывается с опухлеассоциированным антигеном, и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывается с CD16. Любой из этих антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv, такого как scFv, описанный выше. В некоторых вариантах осуществления третий антигенсвязывающий сайт связывается с другим опухлеассоциированным антигеном из HER2. В некоторых

вариантах осуществления третий антигенсвязывающий сайт связывается с тем же опухолеассоциированным антигеном HER2, и примеры форматов показаны на ФИГ. 2С и 2D. Соответственно, полиспецифические связывающие белки могут обеспечивать бивалентное рекрутирование HER2. Бивалентное рекрутирование HER2 с помощью полиспецифических белков может стабилизировать HER2 на поверхности опухолевых клеток и усилить цитотоксичность NK-клеток по отношению к опухолевым клеткам. Бивалентное рекрутирование HER2 с помощью полиспецифических белков может обеспечить более сильное связывание полиспецифических белков с опухолевыми клетками, тем самым облегчая более сильный цитотоксический ответ NK-клеток на опухолевые клетки, особенно в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих HER2 на низком уровне.

[0094] Внутри Fc-домена связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сфокусировано на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене CH2 (см. Sondermann et al., Nature, 406 (6793): 267-273). На основе известных доменов мутации могут быть выбраны для усиления или уменьшения аффинности связывания с CD16, например, с использованием представленных на фаге библиотек или библиотек кДНК, представленных на поверхности дрожжей, или могут быть сконструированы на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

[0095] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела содержит домен CH2 и домен CH3 антитела IgG, например человеческого антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления мутации вводятся в константный домен антитела, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена человеческого IgG1, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1, и которая отличается в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409., T411 и K439. Все положения аминокислот в Fc-домене или шарнирной области, раскрытых в настоящем описании, пронумерованы согласно нумерации EU.

[0096] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1, и которая отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S366K, S364E364, T663, T663, T663, T663, T663, T663, T663, T663, T663 T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399VR,

F40540, Y400K, D399VR, F40740, Y400K, S40540, S400K1 Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[0097] Отдельные компоненты полиспецифических связывающих белков более подробно описаны ниже.

NKG2D-связывающий сайт

[0098] После связывания рецептора NKG2D и рецептора CD16 на клетках-натуральных киллерах и опухолеассоциированного антигена на опухолевых клетках, полиспецифические связывающие белки могут рекрутировать более одного типа NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут выступать агонистами NK-клеток у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут выступать агонистами NK-клеток у человека и других видов, таких как грызуны и яванские макаки.

[0099] В Таблице 1 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи слиты вместе с образованием scFv.

[0100] Связывающие домены NKG2D, перечисленные в Таблице 1, могут различаться по своей аффинности связывания с NKG2D, тем не менее, все они активируют NK-клетки человека.

[0101] Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в Таблице 1, определены в соответствии с Kabat.

Таблица 1		
Клоны	Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:3) - GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:4) - EIDHSGSTNYPNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:5) - ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDFATYYCQ QYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ

	ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:6)	QYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QSNYYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:11)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWGFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQ QSYDIPYTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:15)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:16)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:18)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QSKEVPWTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:19)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:22)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQ QYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP

	WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:24)	KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:40)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)

ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGDSSIRHAYYYYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:44) CDR1 (SEQ ID NO:45) - GTFSSYAIS (не-Kabat) или SYAIS (SEQ ID NO:158) CDR2 (SEQ ID NO:46) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:47) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV (не- Kabat) или GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:159)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQYYSTPITFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:49) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:50) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:51) - QYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEW IGSIYYSGSTYYPNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RGSDRFHPYFDYWGGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1 (SEQ ID NO:53) - GSISSSSYYWG (не-Kabat) или SSSYYWG(SEQ ID NO:160)CDR2 (SEQ ID NO:54) - SIYYSGSTYYPNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:55) - ARGSDRFHPYFDY (не-Kabat) или GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:161)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSRYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLPEPDAVYYCQ QFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:56) CDR1 (SEQ ID NO:57) - RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:58) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:59) - QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARARGPWSFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCEQ YDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARRGRKASGSFYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:63) - GTFSSYAIS(не-Kabat) или SYAIS (SEQ ID NO:158)CDR2 (SEQ ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKPLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDYSYPYTFGQGTK LEIK (SEQ ID NO:66) CDR1 (SEQ ID NO:67) - ESSQSLLNSGNQKNYLT

	NO:64) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) - ARRGRKASGSFYYYYGMDV	CDR2 (SEQ ID NO:68) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:69) - QNDYSYPYT
ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGAPNYGDTTHDYYYMDV WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTSYMH (не-Kabat) или SYMH (SEQ ID NO:162) CDR2 (SEQ ID NO:72) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:73) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (не- Kabat) или GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:163)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74) CDR1 (SEQ ID NO:75) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:76) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:77) - QQYDDWPFT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTGYMHVVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELSLRSDDT AVYYCARDTGEYYDTDDHGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:79) - YTFTGYMH(не-Kabat) или GYMH (SEQ ID NO:164) CDR2 (SEQ ID NO:80) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:81) - ARDTGEYYDTDDHGMDV (не- Kabat) или DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:165)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82) CDR1 (SEQ ID NO:75) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:76) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:85) - QQDDYWPPT
ADI-27744 (A44)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKDGGYYDSGAGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYAMS(не-Kabat) или SYAMS (SEQ ID NO:166) CDR2 (SEQ ID NO:88) - AISGSGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:89) - AKDGGYYDSGAGDY (не-Kabat) или DGGYYDSGAGDY (SEQ ID	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSYPRTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:90) CDR1 (SEQ ID NO:91) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:92) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:93) - QQGVSYPRT

	NO:167)	
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN(не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:97) - ARGAPMGAAAGWFDP (не-Kabat) или GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:169)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGMDYYMDV WGKGTTVTSS (SEQ ID NO:102) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTSYMH(не-Kabat) или SYMH (SEQ ID NO:162) CDR2 (SEQ ID NO:72) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:105) - AREGAGFAYGMDYYMDV (не- Kabat) или EGAGFAYGMDYYMDV (SEQ ID NO:170)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAVYYCQ QSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:144) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN(не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3: (не- Kabat)ARGAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:172) или GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:173)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT

A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPQGAAAGWFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:174) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN(не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVK G CDR3 (не-Kabat) (SEQ ID NO:175) - ARGAPQGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:176) - GAPQGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPLGGAAAGWFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:177) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVK G CDR3 (не-Kabat) (SEQ ID NO:178) - ARGAPLGGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:179) - GAPLGGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPFGGAAAGWFDPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:180) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN(не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVK G CDR3 (не-Kabat) (SEQ ID NO:181) - ARGAPFGGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:182) - GAPFGGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA

	VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPVGAAAGWFDPWGQGT TVSS (SEQ ID NO:183) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVK CDR3 (не-Kabat) (SEQ ID NO:184) - ARGAPVGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:185) - GAPVGAAAGWFDP	PKLLIYAASSLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49-consensus	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPXGAAAGWFDPWGQGT TVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q, или F (SEQ ID NO:186) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (не-Kabat) или SYSMN (SEQ ID NO:168) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVK CDR3 (не-Kabat) (SEQ ID NO:187) - ARGAPXGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:188) - GAPXGAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q, или F	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT

[0102] Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 110, может быть спарен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO: 111, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в US 9273136.

SEQ ID NO: 110

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPL
SGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0103] Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 112, может быть спарен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ

ID NO: 113, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в US 7879985.

SEQ ID NO: 112

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS
ANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTS
S

SEQ ID NO: 113

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

[0104] Полиспецифические связывающие белки могут связываться с NKG2D-экспрессирующими клетками, которые включают, но не ограничиваются ими, NK-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки и CD8+ $\alpha\beta$ T-клетки. При связывании NKG2D полиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D и активации NK-клеток.

[0105] Полиспецифические связывающие белки связываются с клетками, экспрессирующими CD16, рецептором Fc на поверхности лейкоцитов, включая клетки-натуральные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки. Белок согласно настоящему раскрытию связывается с NKG2D с аффинностью KD от 2 нМ до 120 нМ, например, от 2 нМ до 110 нМ, от 2 нМ до 100 нМ, от 2 нМ до 90 нМ, от 2 нМ до 80 нМ, от 2 нМ до 70 нМ, от 2 нМ до 60 нМ, 2 нМ до 50 нМ, от 2 до 40 нМ, от 2 до 30 нМ, от 2 до 20 нМ, от 2 до 10 нМ, примерно 15 нМ, примерно 14 нМ, примерно 13 нМ, примерно 12 нМ, примерно 11 нМ, примерно 10 нМ, примерно 9 нМ, примерно 8 нМ, примерно 7 нМ, примерно 6 нМ, примерно 5 нМ, примерно 4,5 нМ, примерно 4 нМ, примерно 3,5 нМ, примерно 3 нМ, примерно 2,5 нМ, примерно 2 нМ, примерно 1,5 нМ, примерно 1 нМ, от примерно 0,5 нМ до примерно 1 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 2 нМ, от примерно 2 нМ до 3 нМ, от примерно 3 нМ до 4 нМ, от примерно 4 нМ до примерно 5 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 6 нМ, от примерно 6 нМ до примерно 7 нМ, от примерно 7 нМ до примерно 8 нМ, от примерно 8 нМ до примерно 9 нМ, от примерно 9 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 2 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 3 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 4 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 6 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 7 нМ до примерно 10 нМ или от примерно 8 нМ до примерно 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления сайты связывания NKG2D связываются с NKG2D с KD от 10 нМ до 62 нМ.

HER2-связывающий сайт

[0106] HER2-связывающий сайт полиспецифического связывающего белка, раскрытого в настоящем описании, включает вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, слитые вместе с образованием scFv.

[0107] В Таблице 2 перечислены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации

могут связываться с HER2.

Таблица 2		
Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
Трастузумаб	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:114) CDR1(SEQ ID NO:115) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:116) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:117) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:118) CDR1(SEQ ID NO:119) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:120) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:121) - QQHYTTPPT
Трастузумаб (VH и VL в конструкции scFv)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:195) CDR1(SEQ ID NO:115) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:116) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:117) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:196) CDR1(SEQ ID NO:119) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:120) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:121) - QQHYTTPPT
Трастузумаб-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:139)	
Пертузумаб	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSSA (SEQ ID NO:122) CDR1 (SEQ ID NO:123) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:124) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:125) - NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:126) CDR1 (SEQ ID NO:127) - QDVNSIGVA CDR2 (SEQ ID NO:128) - SASRYT CDR3 (SEQ ID NO:129) - QQYYIYPYT
Пертузумаб (VH и VL в конструкции	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKCLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR

scFv)	FTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG TLVTVSSA (SEQ ID NO:197) CDR1 (SEQ ID NO:123) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:124) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:125) - NLGPSFYFDY	FTLTISSLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGCGTKVEIKR (SEQ ID NO:198) CDR1 (SEQ ID NO:127) - QDVSIGVA CDR2 (SEQ ID NO:128) - SASYRYT CDR3 (SEQ ID NO:129) - QYYIYPYT
Пертузумаб scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYT FGCGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKCLEWVADVNPNSGGSIYN QRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGTTLVTSSA (SEQ ID NO:189)	
MGAH22 (US 8802093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLST ASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLE WIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKAT ITADTSSNTAYLQVSRLTSEDYAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQG ASVTSS (SEQ ID NO:130) CDR1 (SEQ ID NO:131) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:132) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:133) - WGGDGFYAMDY	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVNTAVAWYQQKPGHSP KLLIYSASFRTYTGVPDRFTGSRSG TDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YTPPTFGGCTKVEIK (SEQ ID NO:134) CDR1 (SEQ ID NO:135) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:136) - SASFRTY CDR3 (SEQ ID NO:137) - QQHYTPPT
MGAH22 (VH и VL в конструкции scFv)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLST ASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLE WIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKAT ITADTSSNTAYLQVSRLTSEDYAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQG ASVTSSA(SEQ ID NO:199) CDR1 (SEQ ID NO:131) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:132) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:133) - WGGDGFYAMDY	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVNTAVAWYQQKPGHSP KLLIYSASFRTYTGVPDRFTGSRSG TDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YTPPTFGCGTKVEIKR(SEQ ID NO:200) CDR1 (SEQ ID NO:135) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:136) - SASFRTY CDR3 (SEQ ID NO:137) - QQHYTPPT
MGAH22 scFv	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGH SPKLLIYSASFRTYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YTPPTFGCGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGPE LVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTNGYT RYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDYAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGASVTSSA (SEQ ID NO:171)	

[0108] Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с HER2, можно идентифицировать путем скрининга на связывание с

аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO: 138, или ее зрелым внеклеточным фрагментом.

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQGC
QVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNY
ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI
FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP
LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRY
TFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGM
EHLREVRVAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITG
YLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIH
HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPT
QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQC
VACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC
AEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSG
AMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKA
NKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQD
LLNWCMIQAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHA
DGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEK
GERLPQPPICTIDVYIMVKCWMIDSECRPRFRELVSFSESRMARDPQRFVVIQNEGLGPA
SPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSG
GGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLRYSE
DPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSP
GKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAP
PSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV (SEQ ID NO: 138).

[0109] VH и VL scFv могут быть расположены в различных ориентациях. В некоторых вариантах осуществления VL расположена на N-конце по отношению к VH. В некоторых вариантах осуществления VL расположена на C-конце по отношению к VH.

[0110] VH и VL scFv могут быть связаны через линкер, например, пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий линкер. Что касается аминокислотного состава линкера, пептиды выбираются со свойствами, которые придают гибкость, не влияют на структуру и функцию других доменов белков по настоящему изобретению и противостоят отщеплению протеазами. Например, остатки глицина и серина обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. В некоторых вариантах осуществления VL расположена на N-конце по отношению к VH и соединена с VH через линкер.

[0111] Длина линкера (например, гибкого линкера) может быть «короткой», например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков, или «длинной», например, по меньшей мере, 13 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 или 20-25 аминокислотных остатков.

Fc-домен

[0113] Внутри Fc-домена связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сфокусировано на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене CH2 (см. Sonderrmann et al., Nature, 406 (6793): 267-273). На основе известных доменов мутации могут быть выбраны для усиления или уменьшения аффинности связывания с CD16, например, с использованием представленных на фаге библиотек или библиотек кДНК, представленных на поверхности дрожжей, или могут быть сконструированы на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

[0114] Сборка гетеродимерных тяжелых цепей 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. Содействие преимущественной сборке гетеродимеров может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен СН3 каждой константной области тяжелой цепи антитела, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 и US14/830336. Например, могут быть сделаны мутации в домене СН3 на основе человеческого IgG1 и включения различных пар аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, которые позволяют этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Положения аминокислотных замен, представленные ниже, пронумерованы в соответствии с индексом EU, как у Kabat.

[0115] 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, одна аминокислотная замена во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту(аминокислоты) меньшей аминокислотой(аминокислотами), выбранной из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), так что более крупная аминокислотная замена (выпуклость) 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.

[0116] Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по изобретению необязательно может быть связан с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнирные домены, домены СН2 и СН3 с доменом СН1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области, по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области, по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Типичные 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.

[0117] В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в СН1 константной области человеческого IgG1, могут находиться в 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 человеческого IgG1, могут находиться в аминокислоте E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

[0118] Аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в Таблице 4.

Таблица 4		
	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

[0119] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в Таблице 5.

Таблица 5		
	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

[0120] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, показанного в Таблице 6.

Таблица 6		
	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

[0121] Альтернативно, по меньшей мере, одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из Таблицы 7.

Таблица 7	
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

[0122] Альтернативно, по меньшей мере, одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в Таблице 8, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, и положение(я), указанное в столбце «Второй полипептид», заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой.

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

[0123] Альтернативно, по меньшей мере, одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в Таблице 9, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой, и указанное положение(я), указанное в столбце «Второй полипептид», заменено любой известная отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 9	
Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356, или E357	K409, K439, K370, или K392

[0124] Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора в Таблице 10.

Таблица 10	
Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A, и Y407V	T350V, T366L, K392L, и T394W

[0125] Альтернативно или дополнительно, структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть повышена путем введения S354C либо на первой, либо на второй полипептидной цепи, и Y349C на противоположной полипептидной цепи, которая образует искусственный дисульфидный мостик внутри интерфейса двух полипептидов.

[0126] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и где аминокислотная

антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

[0144] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, и где аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

[0145] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, и где аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

[0146] Некоторые белки, описанные в настоящем раскрытии, имеют Fc-домен, который содержит одну или более мутаций, которые снижают способность последовательности Fc индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). По меньшей мере, одна мутация находится в областях, включающих положения аминокислот 232-239, 265-270, 296-299 и 325-332 (см. Want et al., Protein Cell (2018) 9 (1): 63-73). Мутации могут включать аминокислотную замену (относительно человеческого IgG1 дикого типа) в одном или более положениях 233, 234, 235, 297 и 329. Одна или более мутаций могут включать E233P; L234A; L235A; N297A, N297Q, N297G или N297D; и/или P329A, P329G или P329R относительно человеческого IgG1 дикого типа. Одна или более мутаций могут включать E233P; L234A; L235A; N297A, N297Q, N297G или N297D; и/или P329A, P329G или P329R относительно человеческого IgG1 дикого типа. Альтернативно, одна или более мутаций могут включать L234A, L235A и P329A относительно человеческого IgG1 дикого типа. Мутация может присутствовать на каждой из двух полипептидных цепей Fc-домена.

Примеры полиспецифических связывающих белков

[0147] Ниже перечислены примеры TriNKET, содержащих HER2-связывающий scFv и NKG2D-связывающий Fab, каждый из которых связан с константной областью антитела, причем константные области антитела включают мутации, которые делают возможной гетеродимеризацию двух цепей Fc. ScFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), происходящие от антитела против HER2 (например, трастузумаба), и дополнительно включает замену Cys аминокислотных остатков в положении 100 VL и положении 44 VH, тем самым способствуя образованию дисульфидного мостика между VH и VL scFv. VL связана N-концом с VH через линкер (G4S)₄ (SEQ ID NO: 203), а VH связана N-концом с Fc через линкер Ala-Ser. Линкер Ala-Ser включен в последовательность изгиба шарнирной области для баланса между гибкостью и оптимальной геометрией. В некоторых вариантах

осуществления дополнительная последовательность Thr-Lys-Gly может быть добавлена с N-конца или С-конца к последовательности Ala-Ser на шарнире. Используемый в настоящем документе для описания этих примеров TriNKET Fc включает шарнир антитела, CH2 и CH3.

[0148] Соответственно, каждая из TriNKET, описанных ниже, включает следующие три полипептидные цепи:

Цепь А, содержащую от N-конца до С-конца: VH NKG2D-связывающего Fab, CH1 и Fc;

Цепь В, содержащую от N-конца до С-конца: VL HER2-связывающего scFv, (G4S) 4 линкера (SEQ ID NO: 203), VH HER2-связывающего scFv, линкер Ala-Ser и Fc; и

Цепь С, содержащую от N-конца до С-конца: VL NKG2D-связывающего Fab и CL.

[0149] Аминокислотные последовательности примеров TriNKET приведены в Таблице 11.

Таблица 11						
Конструкция TriNKET	NKG2D-связывающий Fab	HER2-связывающий scFv	Fc IgG1 человека	Цепь А	Цепь В	Цепь С
A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб	A49	Трастузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:141	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:142
A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб	A49	Трастузумаб	KiH	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:142
A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб	A49	Пертузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:141	SEQ ID NO:190	SEQ ID NO:142
A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб	A49	Пертузумаб	KiH	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:142
A49-F3'-TriNKET-MGAH22	A49	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO:141	SEQ ID NO:192	SEQ ID NO:142
A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22	A49	MGAH22	KiH	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:193	SEQ ID NO:142
A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб	A49MI	Трастузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:142
A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб	A49MI	Трастузумаб	KiH	SEQ ID NO:194	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:142
A49MI-F3'-TriNKET-Пертузумаб	A49MI	Пертузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:190	SEQ ID NO:142
A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб	A49MI	Пертузумаб	KiH	SEQ ID NO:194	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:142

A49MI- <i>F3'</i> - TriNKET- MGAH22	A49MI	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:192	SEQ ID NO:142
A49MI- <i>F3'</i> - KiH-TriNKET- MGAH22	A49MI	MGAH22	KiH	SEQ ID NO:194	SEQ ID NO:193	SEQ ID NO:142
A44- <i>F3'</i> - TriNKET- <i>Трастузумаб</i>	A44	Трастузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:149
A44- <i>F3'</i> -KiH- TriNKET- <i>Трастузумаб</i>	A44	Трастузумаб	KiH	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:149
A44- <i>F3'</i> - TriNKET- <i>Пертузумаб</i>	A44	Пертузумаб	EW-RVT	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:190	SEQ ID NO:149
A44- <i>F3'</i> -KiH- TriNKET- <i>Пертузумаб</i>	A44	Пертузумаб	KiH	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:149
A44- <i>F3'</i> - TriNKET- MGAH22	A44	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:192	SEQ ID NO:149
A44- <i>F3'</i> -KiH- TriNKET- MGAH22	A44	MGAH22	KiH	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:193	SEQ ID NO:149

[0150] В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок согласно настоящему раскрытию содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, где первая, вторая и третья полипептидные цепи содержат аминокислотные последовательности Цепи А, Цепи В и Цепи С, соответственно, TriNKET, раскрытых в Таблице 11. В некоторых вариантах осуществления первая, вторая и третья полипептидные цепи состоят из аминокислотных последовательностей Цепи А, Цепи В и Цепи С, соответственно, TriNKET, раскрытых в Таблице 11.

[0151] В иллюстративном варианте осуществления Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит мутации Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с scFv HER2, содержит соответствующие мутации K360E и K409W для образования гетеродимера. В одном варианте осуществления Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит мутации «выступов» T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с HER2-связывающим scFv, содержит мутацию «впадин» T366W. В иллюстративном варианте осуществления Fc-домен связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, включает замену S354C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C на Fc, связанном с HER2-связывающим scFv.

[0152] Конкретные TriNKET и их полипептидные цепи более подробно описаны ниже. В аминокислотных последовательностях линкеры (G4S)₄ (SEQ ID NO: 203) и Ala-Ser подчеркнуты и выделены жирным шрифтом; Остатки Cys в scFv, которые образуют дисульфидные мостики, подчеркнуты и выделены жирным курсивом; Мутации

гетеродимеризации Fc подчеркнуты и выделены жирным шрифтом; и последовательности CDR согласно Kabat подчеркнуты.

[0153] Например, TriNKET по настоящему изобретению представляет собой A49-F3'-TriNKET-трастузумаб. A49-F3'-TriNKET-трастузумаб включает одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) (SEQ ID NO: 139), полученный из трастузумаба, который связывается с HER2, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A49, включая часть тяжелой цепи, содержащей переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 94) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98), и константный домен легкой цепи, где переменный домен тяжелой цепи соединен с доменом CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом. A49-F3'-TriNKET-трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 142.

[0154] SEQ ID NO: 140 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 141, как описано ниже. ScFv (SEQ ID NO: 139) включает переменный домен тяжелой цепи трастузумаба, связанный с N-концом переменного домена легкой цепи трастузумаба через линкер (G4S) 4 (SEQ ID NO: 203), scFv представлен как VL-(G4S)4-VH («(G4S)4» представлен SEQ ID NO: 203 или SEQ ID NO: 143). Переменные домены тяжелой и легкой цепи scFv также связаны дисульфидным мостиком между C100 VL и C44 VH в результате замен Q100C и G44C в VL и VH, соответственно.

Трастузумаб scFv

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGSGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVVSS (SEQ ID NO:139)

Трастузумаб scFv-Fc (RVT)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGCGTKVEIK
GGGGSGGGSGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLYSDSGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:140)

[0155] SEQ ID NO: 141 представляет собой часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, которая включает переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 94) NKG2D-связывающего сайта и домен CH1, связанный с Fc-доменом. Fc-домен в SEQ ID NO: 141 включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C на Fc, связанном с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 140). В SEQ ID NO: 141 Fc-домен также включает замены K360E и K409W для гетеродимеризации с Fc в SEQ ID NO: 140.

A49VH

EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTFSS}SYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS
SYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:94)

A49 VH-CH1-Fc (EW)

EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTFSS}SYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS
SYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:141)

[0156] SEQ ID NO: 142 представляет собой часть легкой цепи Fab-фрагмента, содержащую переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98) NKG2D-связывающего сайта и константный домен легкой цепи.

A49 VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSEFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:98)

A49 VL-LC

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSEFPTFGGGTKVEIK
RTVAAPSPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:142)

[0157] Другой TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49MI-F3'-TriNKET-трастузумаб. A49MI-F3'-TriNKET-трастузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), что и A49-F3'-TriNKET-трастузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser для Fc-домена; и NKG2D-связывающий

Fab-фрагмент, полученный из A49MI, включая участок тяжелой цепи, содержащий переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 144) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащей переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98) и константный домен легкой цепи, где переменный домен тяжелой цепи соединен с доменом CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом. A49MI-F3'-TriNKET-трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 140 (как в A49-F3'-TriNKET-трастузумаб), SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-трастузумаб).

[0158] SEQ ID NO: 145 представляет собой часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, которая включает переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 144) NKG2D-связывающего сайта и домен CH1, связанный с Fc-доменом. В SEQ ID NO: 144, где метионин в CDR3 SEQ ID NO: 94 заменен изолейцином (замена М I; показана в квадратных скобках [] в SEQ ID NO: 144 и SEQ ID NO: 145). Fc-домен в SEQ ID NO: 145 включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C в Fc, связанном с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 140). В SEQ ID NO: 145 Fc-домен также включает замены K360E и K409W.

A49MI VH

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS
SYIYYADSVKGRFTISRDN~~A~~KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP[~~I~~]GAAAGWFDPW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:144)

A49MI VH-CH1-Fc (EW)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS
SYIYYADSVKGRFTISRDN~~A~~KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP[~~I~~]GAAAGWFDPW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQV~~C~~TLPPSRDELTE~~N~~QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYS~~W~~LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:145)

[0159] Другой TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49-F3'-KiH-TriNKET-трастузумаб. KiH относится к технологии Fc «выступ во впадине» (KiH), которая включает конструирование доменов CH3 для создания «выступа» или «впадины» в каждой тяжелой цепи, чтобы способствовать гетеродимеризации. Концепция технологии KiH Fc заключалась в том, чтобы ввести «выступ» в одном домене CH3 (CH3A) путем замены небольшого остатка на объемный (например, T366WCH3A в нумерации EU). Чтобы приспособить «выступ», на другом домене CH3 (CH3B) была создана комплементарная поверхность «впадины» путем замены ближайших соседних к выступу остатков на меньшие (т. е. T366S/L368A/Y407VCH3B). Мутация «впадины» была оптимизирована путем структурно-управляемого скрининга 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).

Рентгенокристаллические структуры вариантов KiH Fc (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, et al., Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J. Mol. Biol.* (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.* (2014) 58 (1): 132-8) продемонстрировали, что гетеродимеризация термодинамически поддерживается гидрофобными взаимодействиями, обусловленными стерической комплементарностью в коровом интерфейсе между CH3-доменами, тогда как интерфейсы выступ-выступ и впадина-впадина не благоприятствуют гомодимеризации вследствие стерических помех и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

[0160] A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), что и A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом, содержащим замены «впадины» замены T366S, L368A и Y407V; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом, содержащим замену «выступа» T366W. A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0161] SEQ ID NO: 146 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv (SEQ ID NO: 139), связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены T366S, L368A и Y407V для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 147, как описано ниже.

Трастузумаб scFv-Fc (KiH)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGCGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:146)

[0162] SEQ ID NO: 147 представляет собой часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, которая включает переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 94) NKG2D-связывающего сайта, полученного из A49, и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-

домен в SEQ ID NO: 147 включает замену S354C, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C в домене CH3 Fc, связанного с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 146). В SEQ ID NO: 147 Fc-домен также включает замены K360E и K409W.

A49VH-CH1-Fc (KiH)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:147)

[0163] Другим TriNKET согласно настоящему раскрытию является A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), что и A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом, содержащим замены «впадины» T366S, L368A и Y407V; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом, содержащим замену «выступа» T366W. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 146 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб), SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

SEQ ID NO: 194 представляет собой часть тяжелой цепи Fab-фрагмента, которая включает переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 144) NKG2D-связывающего сайта, полученного из A49MI, и домен CH1, соединенный с Fc-доменом. Fc-домен в SEQ ID NO: 194 включает замену S354C, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C в домене CH3 Fc, связанного с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 146). В SEQ ID NO: 194 Fc-домен также включает замены K360E и K409W.

A49MIVH-CH1-Fc (KiH)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:194)

[0165] Другой пример TriNKET по настоящему изобретению представляет собой A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб. A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, связанный

через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, полученный из A44, включая часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 86) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 90) и константный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи соединен с доменом CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом. A44-F3'-TriNKET-трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 140 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб), SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 149.

[0166] SEQ ID NO: 155 представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 86) NKG2D-связывающего сайта, полученного из A44, соединенного с Fc-доменом. Fc-домен в SEQ ID NO: 155 включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C на Fc, связанном с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 140). В SEQ ID NO: 155 Fc-домен также включает замены K360E и K409W.

A44 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYW
GQGT LVT VSS (SEQ ID NO:86)

A44VH-CH1-Fc (EW)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVCTLPSPSRDELTE~~N~~QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYS~~W~~LTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:155)

[0167] SEQ ID NO: 149 представляет собой часть легкой цепи Fab-фрагмента, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 90) NKG2D-связывающего сайта и константный домен легкой цепи.

A44 VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:90)

A44 VL-CL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:149)

[0168] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет

собой A44-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб. A44-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), что и A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом, содержащим замены «впадины» T366S, L368A и Y407V; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом, содержащим замену «выступа» T366W. A44-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 146 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб), SEQ ID NO: 148 и SEQ ID NO: 149 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0169] SEQ ID NO: 148 представляет собой переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO: 86) NKG2D-связывающего сайта, полученного из A44, соединенного с Fc-доменом. Fc-домен в SEQ ID NO: 148 включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C на Fc, связанном с HER2-связывающим scFv (SEQ ID NO: 146). В SEQ ID NO: 148 Fc-домен также включает замену T366W.

A44 VH-CH1-Fc (KiH)

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:148)

[0170] Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб. A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб включает scFv (SEQ ID NO: 189), полученный из пертузумаба, который связывается с HER2, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 141 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49 -F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0171] SEQ ID NO: 190 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 141, как описано выше. ScFv (SEQ ID NO: 189) включает переменный домен тяжелой цепи пертузумаба, связанный с N-концом переменного домена легкой цепи пертузумаба через линкер a (G4S) 4 (SEQ ID NO: 203), scFv

представлен как VL- (G4S) 4-VH («(G4S)4» представлен SEQ ID NO: 203 или SEQ ID NO: 143). Вариабельные домены тяжелой и легкой цепи scFv также связаны дисульфидным мостиком между C100 VL и C44 VH в результате замен Q100C и G44C в VL и VH, соответственно.

Пертузумаб scFv

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGCGTKVEIKR
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKCLEWVADVNP
 NSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ
 GTLVTVSSA(SEQ ID NO:189)

Пертузумаб scFv-Fc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGCGTKVEIKR
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKCLEWVADVNP
 NSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ
 GTLVTVSSA

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0172] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49MI-F3'-TriNKET-Пертузумаб. A49MI-F3'-TriNKET-Пертузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 189), что и A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser для Fc-домена; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A49MI-F3'-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 190 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб), SEQ ID NO: 145 (как в A49MI-F3'-TriNKET -Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0173] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб. A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 189), что и A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены "впадины" T366S,

L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющие последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 147 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0174] SEQ ID NO: 191 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv (SEQ ID NO: 189), связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены T366S, L368A и Y407V для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 191, как описано выше.

Пертузумаб scFv-Fc (KiH)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR
TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGCCTGKVEIKR

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKCLEWVADVNP
NSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQ
GTLVTVSSA

AS

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:191)

[0175] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 189), что и A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены "впадины" T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 191 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб), SEQ ID NO: 194 (как в A49MI-F3' -KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0176] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A44-F3'-TriNKET-Пертузумаб. A44-F3'-TriNKET-Пертузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 189), что и A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A44-

F3'-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющие последовательности SEQ ID NO: 190 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб), SEQ ID NO: 155 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 149 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0177] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A44-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб. A44-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 189), что и A49-F3'-TriNKET-Пертузумаб, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены «впадины» T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A44-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 191 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Пертузумаб), SEQ ID NO: 148 (как в A44-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 149 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0178] Другой TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49-F3'-TriNKET-MGАН22. A49-F3'-TriNKET-MGАН22, включая scFv (SEQ ID NO: 171), полученный из MGАН22, который связывается с HER2, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A49-F3'-TriNKET-MGАН22 включает три полипептида, имеющие последовательности SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 141 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0179] SEQ ID NO: 192 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv, связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 141, как описано выше. ScFv (SEQ ID NO: 171) включает переменный домен тяжелой цепи пертузумаба, соединенный с N-концом переменного домена легкой цепи пертузумаба через линкер (G4S)₄ (SEQ ID NO: 203), scFv представлен как VL-(G4S)₄-VH («(G4S)₄» представлен SEQ ID NO: 203 или SEQ ID NO: 143). Переменные домены тяжелой и легкой цепи scFv также связаны дисульфидным мостиком между C100 VL и C44 VH в результате замен G100C и G44C в VL и VH, соответственно.

MGАН22 scFv

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFR
YTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKR
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
 QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHVVKQRPEQCLEWIGRIYPTN

GYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GASVTVSSA (SEQ ID NO:171)

MGAH22 scFv-Fc

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAWYQQKPGHSPKLLIYSASFR
YTGVDPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQOHYTPPTFGCGTKVEIKR
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTN
GYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GASVTVSSA

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:192)

[0180] Другой TriNKET по настоящему изобретению представляет собой A49MI-F3'-TriNKET-MGAH22. A49MI-F3'-TriNKET-MGAH22 включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 171), что и A49-F3'-TriNKET-MGAH22, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22 включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 192 (как в A49-F3'-TriNKET-MGAH22), SEQ ID NO: 145 (как в A49MI-F3'-TriNKET - Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0181] Другой TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22. A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22 включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 171), что и A49-F3'-TriNKET- MGAH22, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены «впадины» T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22 включает три полипептида, имеющие последовательности SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 147 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142. (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0182] SEQ ID NO: 193 представляет собой полную последовательность HER2-связывающего scFv (SEQ ID NO: 171), связанного с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc). Fc-домен, связанный с scFv, включает замены T366S, L368A и Y407V для гетеродимеризации и замену S354C для образования дисульфидной связи с заменой Y349C в SEQ ID NO: 147, как описано выше.

MGAN22 scFv-Fc (KiH)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFR
YTGVDPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKR
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

QVQLQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTN
GYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDNAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
 GASVTVSSA

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:193)

[0183] Другой пример TriNKET по настоящему изобретению представляет собой A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22 включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 171), что и A49-F3'-TriNKET-MGAN22, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены «впадины» T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22 включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 193 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22), SEQ ID NO: 194 (как в A49MI-F3' -KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 142 (как в A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0184] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A44-F3'-TriNKET-MGAN22. A44-F3'-TriNKET-MGAN22 включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 171), что и в A49-F3'-TriNKET-MGAN22, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены Q347R, D399V и F405T, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замены K360E и K409W. A44-F3'-TriNKET-MGAN22 включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 192 (как в A49-F3'-TriNKET-MGAN22), SEQ ID NO: 155 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 149 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0185] Другой пример TriNKET согласно настоящему раскрытию представляет собой A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22. A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAN22 включает тот же Her2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 171), что и A49-F3'-TriNKET-MGAN22, связанный через шарнир, содержащий Ala-Ser, с Fc-доменом; и тот же самый NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, что и в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб, домен CH1 которого соединен с Fc-доменом. Fc-домен, связанный с scFv, включает замены «впадины» T366S, L368A и

Y407V, а Fc-домен, связанный с Fab-фрагментом, включает замену «выступа» T366W. A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22 включает три полипептида, имеющих последовательности SEQ ID NO: 193 (как в A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22), SEQ ID NO: 148 (как в A44-F3' -KiH-TriNKET-Трастузумаб) и SEQ ID NO: 149 (как в A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб).

[0186] В определенном варианте осуществления TriNKET согласно настоящему раскрытию идентичен одному из примеров TriNKET, описанных выше, который включает мутации Fc EW-RVT, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены Q347R, D399V, и F405T, а Fc-домен, связанный с HER2-связывающим scFv, содержит соответствующие замены K360E и K409W для образования гетеродимера. В некоторых вариантах осуществления TriNKET согласно настоящему раскрытию идентичен одному из примеров TriNKET, описанных выше, который включает KiH Fc мутации, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, содержит замены «впадины» T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен, связанный с HER2-связывающим scFv, содержит замену «выступа» T366W для образования гетеродимера.

[0187] В некоторых вариантах осуществления TriNKET согласно настоящему раскрытию идентичен одному из примерных TriNKET, описанных выше, за исключением того, что Fc-домен, связанный с NKG2D-связывающим Fab-фрагментом, включает замену S354C в домене CH3, а Fc-домен, связанный с HER2-связывающий scFv включает подходящую замену Y349C в домене CH3 для образования дисульфидной связи.

[0188] Квалифицированный специалист в данной области техники поймет, что во время продуцирования и/или хранения белков N-концевой глутамат (E) или глутамин (Q) может циклизироваться с образованием лактама (например, спонтанно или катализируемым ферментом, присутствующим во время продуцирования и/или хранения). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где N-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида представляет собой E или Q, здесь также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с заменой E или Q на пироглутамат.

[0189] Квалифицированный специалист в данной области также поймет, что во время продуцирования и/или хранения белка C-концевой лизин (K) белка может быть удален (например, спонтанно или катализируемый ферментом, присутствующим во время продуцирования и/или хранения). Такое удаление K часто наблюдается у белков, которые содержат Fc-домен на своем C-конце. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где C-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида (например, последовательности Fc-домена) представляет собой K, соответствующая аминокислотная последовательность с удаленным K также рассматривается в настоящем описании.

[0190] Полиспецифические белки, описанные выше, могут быть получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК, хорошо известных специалисту в

данной области. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый экспрессирующий вектор; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй экспрессирующий вектор; третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь иммуноглобулина, можно клонировать в третий экспрессирующий вектор; первый, второй и третий экспрессирующие векторы могут стабильно трансфецироваться вместе в клетки-хозяева для продуцирования мультимерных белков.

[0191] Для достижения наибольшего выхода полиспецифического белка можно изучить различные соотношения первого, второго и третьего экспрессирующего вектора, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для генерации банка клеток с использованием методов, известных в данной области, таких как лимитированное разведение, ИФА, FACS, микроскопия или Clonепix.

[0192] Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для масштабирования для биореактора и поддержания экспрессии полиспецифического белка. Полиспецифические белки могут быть выделены и очищены с использованием методов, известных в данной области, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, обменную хроматографию гидрофобного взаимодействия и смешанный режим хроматографии.

II. Характеристика полиспецифических белков

[0193] В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок согласно настоящему раскрытию, например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, который включает NKG2D-связывающий Fab-фрагмент и HER2-связывающий scFv-домен, связывается с клетками, экспрессирующими HER2 на низком уровне, при уровне выше, чем у моноклонального антитела, имеющего такой же HER2-связывающий домен. Например, полиспецифические связывающие белки, которые включают NKG2D-связывающий домен Fab и HER2-связывающий домен svFv, полученный из трастузумаба, например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, могут связываться с клетками, экспрессирующими HER2 на низком уровне, при уровне выше, чем у трастузумаба.

[0194] Более того, описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки более эффективны в снижении роста опухоли и уничтожении опухолевых клеток. Например, полиспецифический связывающий белок по настоящему изобретению, который нацелен на экспрессирующие HER2 опухолевые/злокачественные клетки, более эффективен, чем трастузумаб. TriNKET согласно настоящему раскрытию A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб (содержащий HER2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), связанный с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc, представленный SEQ ID NO: 140); и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, включающий часть тяжелой

цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи ADI-27749 (A49) (SEQ ID NO: 94) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98) и константный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи соединен с CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом (часть тяжелой цепи, представленная как VH-CH1-Fc, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 141)), эффективен для стимулирования NK-опосредованного лизиса клеток линии опухолевых клеток человека с низким уровнем экспрессии HER2 (HER2+), тогда как трастузумаб демонстрирует небольшую активность против этой линии клеток. Более того, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб обладает превосходным NK-опосредованным лизисом линии опухолевых клеток человека с более высокой экспрессией, чем линия клеток HER2+ (HER2++), по сравнению с трастузумабом. И даже против линии опухолевых клеток человека с наивысшим уровнем экспрессии HER2 (по сравнению с линиями клеток HER+ и HER2++) (HER2+++), A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб имеет превосходный NK-опосредованный лизис клеток по сравнению с трастузумабом.

[0195] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб, A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб), замедляют прогрессирование опухоли более эффективно, чем моноклональные антитела, которые включают тот же опухолевый антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические связывающие белки, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб, A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб), более эффективны против метастазов рака, чем моноклональные антитела, которые включают тот же опухолевый антигенсвязывающий домен.

[0196] Описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб, A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб), связываются с незлокачественными клетками человека (например, кардиомиоцитами человека) в той же степени, что и с опухолевыми клетками HER2++ (средний уровень экспрессии). Однако, несмотря на сопоставимое связывание, полиспецифические связывающие белки не индуцируют NK-опосредованную гибель здоровых незлокачественных клеток человека (например, кардиомиоцитов человека).

[0197] Полиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем документе, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49MI-F3'-TriNKET-Трастузумаб, A49-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб, A44-F3'-TriNKET-Трастузумаб), запускают лизис CD8+ Т-лимфоцитами опухолевых клеток, положительных по опухолеассоциированному антигену (ТАА+). Например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб усиливает цитотоксическую активность первичных CD8+ Т-клеток человека после культивирования с IL-15 дозозависимым образом (ФИГ. 13А). A49-F3'-

TriNKET-Трастузумаб также усиливает цитотоксическую активность первичных CD8⁺ Т-клеток человека после культивирования с IL-2 (ФИГ. 13В). Напротив, моноклональные антитела против HER2, маргетуксимаб или трастузумаб, не имеют подобных эффектов.

[0198] Маргетуксимаб (также называемый MGAH22) представляет собой Fc-оптимизированное моноклональное антитело, которое связывается с HER2. Варибельный домен тяжелой цепи маргетуксимаба представлен SEQ ID NO: 130, а варибельный домен легкой цепи маргетуксимаба представлен SEQ ID NO: 134. Маргетуксимаб включает замены F243L, R292P, Y300L и P396L в Fc-домене, которые предназначены для мутаций, усиливающих ADCC. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 153, соответственно. Замены F243L, R292P, Y300L и P396L подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Тяжелая цепь MGAH22

QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTN
GYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GASVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELVGGPSVFL**L**PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKP**P**EEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**T**TP**L**VLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:151)

Легкая цепь MGAH22

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFR
YTGVPRDFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYYTTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:153)

[0199] По сравнению с несколькими TriNKET, нацеленными на HER2, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб демонстрирует слабое связывание с клетками, экспрессирующими NKG2D. Полиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем документе, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб), демонстрируют значительное преимущество в эффективности и максимальном лизисе клеток-мишеней по сравнению с комбинацией Fc-молчащего TriNKET («A49si-F3'-TriNKET-Трастузумаб»); аминокислотная последовательность константной области имеет мутации L234A, L235A и P329G (LALAPG), которые снижают эффекторные функции Fc, и трастузумаба, когда клетками-мишенями были HER2⁺ (786- О-клетки) (ФИГ. 19) или HER2⁺⁺ (клетки H661) (ФИГ. 20), что позволяет предположить, что A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб может опосредовать зависимое от функциональных эффекторных клеток уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих HER2.

[0200] Соответственно, по сравнению с моноклональными антителами, описанные в настоящем документе полиспецифические связывающие белки (например, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) являются предпочтительными при лечении злокачественных

опухолей, экспрессирующих HER2.

III. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

[0201] Изобретение относится к способам лечения онкологического заболевания с использованием полиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем документе, и/или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. Способы можно использовать для лечения различных видов злокачественных новообразований, которые экспрессируют HER2, путем введения пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества полиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем документе.

[0202] Терапевтический метод можно охарактеризовать в соответствии с лечением онкологического заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой рак молочной железы, яичников, пищевода, мочевого пузыря или желудка, карциному слюнных протоков, аденокарциному легких или агрессивные формы рака матки, такие как серозная карцинома эндометрия матки.

[0203] В некоторых других вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой рак мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легких, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак почек, рак желудка, рак яичек или рак матки. Еще в других вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральнo-лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидно-кистозную карциному, аденому, аденосаркому, железисто-плоскоклеточную карциному, рак анального канала, анальный рак, ректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, рак печени, рак костей, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхиальной железы, карциноид, холангиокарциному, хондосаркому, хориодпапиллому/карциному, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермальной пазухи, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, эндотелиальный рак, эпендимальный рак, эпителиально-клеточный рак, саркому Юинга, рак глаз и глазной орбиты, рак женских половых органов, фокальную нодулярную гиперплазию, рак желчного пузыря, рак полости желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиому, гемангиомы, печеночную аденому, печеночный аденоматоз, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак

подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интраэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутривенных желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак соединительной ткани, саркому Капоши, рак малого таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, лентигино-меланому, лимфому, рак мужских половых органов, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатический рак, рак полости рта, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового канала, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, нодулярную меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточный рак, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярную серозную аденокарциному, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак пазухи, рак кожи, мелкоклеточный рак, рак тонкого кишечника, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечно-полосатых мышц, субмезотелиальный рак, меланому поверхностного распространения, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированный рак, рак мочевого пузыря, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочеполовой системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, бородавчатый рак, Випому, рак вульвы, хорошо дифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

[0204] В некоторых других вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная средостенная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, малоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома мантийных клеток, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, В-клеточная лимфома экстранодальной маргинальной зоны, В-клеточная узловатая лимфома маргинальной зоны, В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки, лимфома Беркитта, лимфоплазмочитарная лимфома, волосатоклеточный лейкоз или лимфома первичной центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как лимфобластная лимфома предшественников Т-клеток, периферическая Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная лимфома клеток-натуральных киллеров/Т-клеток, узловатая Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома типа подкожного панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома или узловатая Т-клеточная лимфома.

[0205] В некоторых других вариантах осуществления онкологическое заболевание

представляет собой рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак желудка, почечно-клеточную карциному, аденокарциному легких, рак простаты, холангиокарциному, рак матки, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак яичников, рак шейки матки, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак легкого, мезотелиому, рак печени, саркому и рак желчного пузыря.

[0206] Подлежащее лечению онкологическое заболевание можно охарактеризовать по наличию определенного антигена, экспрессируемого на поверхности опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления злокачественная клетка может экспрессировать один или более из следующих факторов в дополнение к HER2: 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.

IV. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

[0207] Еще один аспект изобретения предусматривает комбинированную терапию. Полиспецифический связывающий белок, описанный в настоящем документе, может использоваться в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения онкологического заболевания.

[0208] Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в качестве части комбинированной терапии при лечении онкологического заболевания, включают, например, облучение, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронит, метотрексат, доксорубицин, карбоквон, пентостатин, нитракрин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбина, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезины, флутамид, дрогенил, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофилин, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфат, эноцитабин, лизурид, оксимететолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпителиостанол, форместан, интерферон альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма (IFN- γ), колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин дифитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и вариации вышеупомянутых агентов, которые могут проявлять дифференциальное связывание с их родственными рецепторами, а также увеличивать или уменьшать период полужизни в сыворотке.

[0209] Дополнительный класс агентов, которые могут быть использованы в качестве части комбинированной терапии при лечении онкологического заболевания, относится к ингибиторам иммунной контрольной точки. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают агенты, которые ингибируют один или более из (i) антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими лимфоцитами (CTLA4), (ii) белка запрограммированной клеточной смерти 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.

[0210] Другие агенты, которые могут быть использованы в качестве части комбинированной терапии при лечении злокачественного новообразования, представляют собой агенты моноклональных антител, которые нацелены на мишени, отличные от контрольных точек (например, герцептин), и нецитотоксические агенты (например, ингибиторы тирозинкиназы).

[0211] Другие категории противоопухолевых агентов включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора репарации исключения оснований, ингибитора Bcr-Abl тирозинкиназы, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклин-зависимой киназы, ингибитора DNA-ПК, ингибитора как DNA-ПК, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлор-дезоксиаденозин, ингибитора HDAC, ингибитора сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора обоих PARP1 и DHODH, протеасомного ингибитора, ингибитора топоизомеразы-II, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора VEGFR и ингибитора WEE1; (ii) агонист OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 или ICOS; и (iii) цитокин, выбранный из IL-12, IL-15, GM-CSF и G-CSF.

[0212] Белки по изобретению также можно использовать в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного поражения.

[0213] Количество полиспецифического связывающего 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, полиспецифический связывающий белок может быть введен в течение времени, когда дополнительный терапевтический агент(ы) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[0214] Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в настоящем документе. Композиция может быть приготовлена для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Одно или более физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей также могут быть включены в композицию для подходящего состава. Подходящие составы для использования в настоящем раскрытии есть 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).

[0215] Композиция для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В некоторых вариантах осуществления состав может представлять собой лиофилизированный состав или жидкий состав. В определенных вариантах осуществления состав может быть заморожен-высушен (лиофилизирован) и может содержаться в 12-60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть лиофилизирована, и 45 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления примерно 40-100 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в составе внутривенного лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую композицию и храниться в концентрации примерно от 250 мг/на флакон примерно до 1000 мг/на флакон. В определенных вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую композицию и храниться в концентрации примерно 600 мг/на флакон. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой жидкую композицию и храниться в концентрации примерно 250 мг/на флакон.

[0216] Белок может существовать в жидкой фармацевтической композиции в виде водного раствора, включающей терапевтически эффективное количество белка в буферном растворе с образованием композиции.

[0217] Эти 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 раствором носителя перед введением. РН препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в виде нескольких однократных единиц, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для изменяемого количества.

[0218] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к составу с увеличенным сроком хранения, включающему белок по настоящему изобретению, в сочетании с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

[0219] В некоторых вариантах осуществления готовят водный состав, включающий

белок по настоящему изобретению в буферном растворе для поддержания pH. Буфер по настоящему изобретению может иметь pH в диапазоне примерно от 4 примерно до 8, например, примерно от 4,5 примерно до 6 или примерно от 4,8 примерно до 5,5, или может иметь pH примерно от 5 примерно до 5,2. 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 контролировать pH в этом диапазоне, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот.

[0220] В определенных вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне примерно от 4 примерно до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH может составлять примерно от 4,5 примерно до 6, или примерно от pH 4,8 примерно до 5,5, или в диапазоне pH примерно от 5 примерно до 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает в себя примерно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), примерно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), примерно 1,5 мг/мл динатрийфосфата, дигидрат (например, 1,53 мг/мл), примерно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86) и примерно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает от примерно 1 до 1,5 мг/мл лимонной кислоты, от примерно 0,25 до 0,5 мг/мл цитрата натрия, от примерно 1,25 до 1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, от примерно 0,7 до 1,1 мг/мл дигидрат дигидрофосфата натрия и примерно от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления pH композиции доводят с помощью гидроксида натрия.

[0221] 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 некоторых вариантах осуществления водная композиция может быть изотонической. 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 для повышения тоничности, представляет собой маннит. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно от 5 примерно до 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 7,5-15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 10-14 мг/мл. В

некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления полиол сорбит может быть включен в состав.

[0222] Детергент или поверхностно-активное вещество также могут быть добавлены в состав. Примеры детергентов включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т. д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно уменьшает агрегацию антитела в составе 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 композиция может содержать детергент полисорбат 80 или Tween 80. Tween 80 - это термин, используемый для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать примерно от 0,1 примерно до 10 мг/мл полисорбата 80 или примерно от 0,5 примерно до 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в композицию можно добавлять примерно 0,1% полисорбата 80.

[0223] В некоторых вариантах осуществления белковый продукт по настоящему изобретению приготовлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл во флаконе любого типа Фармакопеи США/Европейской Фармакопеи типа I 50R, закрытом резиновой пробкой и запечатанном с использованием алюминиевого обжимного уплотнения. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего Фармакопее США и Европейской Фармакопее. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены примерно 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем примерно 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен примерно 0,9% физиологическим раствором.

[0224] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав по изобретению может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром на стабилизирующем уровне. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен в водном растворе носителя. 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 представлять собой дисахариды, например сахарозу. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав также может включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества и консерванта.

[0225] В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава может быть установлено путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может

представлять собой соляную кислоту. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

[0226] В дополнение к агрегации, дезамидирование является распространенным вариантом продукта пептидов и белков, который может возникать во время ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного продукта и во время анализа образца. Дезамидирование представляет собой потерю NH_2 из белка с образованием промежуточного сукцинимид, который может подвергаться гидролизу. Промежуточный сукцинимид приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение промежуточного сукцинимид затруднено из-за нестабильности в водных условиях. По существу, дезамидирование обычно определяется как увеличение массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит к получению аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоты. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую постоянную растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, соседствующие с Asn в пептидной цепи, влияют на скорости дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой чувствительности к дезамидированию.

[0227] В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция по настоящему изобретению может быть сохранена в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

[0228] Представляющий интерес водный носитель в настоящем описании 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), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0229] Консервант необязательно может быть добавлен в составы для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразового (многодозового) состава.

[0230] Внутривенные (IV) составы могут быть предпочтительным путем введения в конкретных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации, получая все лекарственные средства посредством IV пути. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия перед введением. В некоторых вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и пригодным для введения путем внутривенной инфузии.

[0231] В некоторых вариантах осуществления соль или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве 10 mM - 200 mM. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот

(неорганических и органических) с металлами, «образующими основание», или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой глицинатный, карбонатный, цитратный буферы, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[0232] Консервант необязательно может быть добавлен в составы для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразового (многодозового) состава.

[0233] Представляющий интерес водный носитель в настоящем описании 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), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0234] Белок по настоящему изобретению может существовать в лиофилизированном составе, включающем белки и лиопротектор. Лиопротектором может быть сахар, например дисахариды. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лيوфилизированный состав может также включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества, наполнителя и/или консерванта.

[0235] Количество сахарозы или мальтозы, полезное для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, 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.

[0236] В некоторых вариантах осуществления pH состава перед лиофилизацией может быть установлено путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой соляную кислоту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может быть гидроксид натрия.

[0237] Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, можно доводить в диапазоне от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

[0238] В некоторых вариантах осуществления соль или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве 10 мМ - 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами, «образующими основание», или аминами. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может представлять собой глицинатный, карбонатный, цитратный буферы, и в этом случае ионы натрия, калия или

аммония могут служить в качестве противоиона.

[0239] В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен «наполнитель». «Наполнитель» представляет собой соединение, которое добавляет массу к лиофилизированной смеси и способствует физической структуре лиофилизированной таблетки (например, облегчает производство по существу однородной лиофилизированной таблетки, которая поддерживает структуру с открытыми порами). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лيوфилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

[0240] Консервант необязательно может быть добавлен в составы для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, способствовать получению многоразового (многодозового) состава.

[0241] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может состоять из водного раствора носителя. Представляющий интерес водный носитель настоящего описания является фармацевтически приемлемым (например, 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.

[0242] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему описанию восстанавливается либо стерильной водой для инъекций, USP (SWFI), либо примерно 0,9% хлорида натрия для инъекций, USP. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

[0243] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему изобретению состоит из примерно 4,5 мл воды для инъекций и разбавляется 0,9% солевым раствором (раствор хлорида натрия).

[0244] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьироваться так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения искомого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и режима введения, без токсичности для пациента.

[0245] Конкретная доза может представлять собой унифицированную дозу для каждого пациента, например, 50-5000 мг белка. Альтернативно, доза для пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы в определении подходящей дозировки могут включать заболевание или состояние, которое подлежит лечению или предотвращению, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Специалисты в данной области обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозировки для лечения, особенно в свете информации о дозировке и анализах, раскрытых в настоящем документе. Дозировка также может быть определена

путем использования известных анализов для определения доз, используемых в сочетании с соответствующими данными доза-ответ. Дозировка индивидуального пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием заболевания. Уровни в крови нацеливающей конструкции или комплекса у пациента могут быть измерены, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может использоваться для определения того, какие нацеливающие 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).

[0246] Как правило, дозы на основе массы тела, составляют примерно от 0,01 мкг примерно до 100 мг на кг массы тела, например, примерно от 0,01 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 100 мкг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 50 мкг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 10 мкг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 1 мкг/кг массы тела, примерно от 0,01 мкг примерно до 0,1 мкг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 100 мкг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 50 мкг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 10 мкг/кг массы тела, примерно от 0,1 мкг примерно до 1 мкг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 100 мкг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 50 мкг/кг массы тела, примерно от 1 мкг примерно до 10 мкг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 100 мкг/кг массы тела, примерно от 10 мкг примерно до 50 мкг/кг массы тела, примерно от 50 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 50 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 50 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 50 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 50 мкг примерно до 100 мкг/кг массы тела, примерно от 100 мкг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 100 мкг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 100 мкг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 100 мкг примерно до 1 мг/кг массы тела, примерно от 1 мг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 1 мг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 1 мг примерно до 10 мг/кг массы тела, примерно от 10 мг примерно до 100 мг/кг массы тела, примерно от 10 мг примерно до 50 мг/кг массы тела, примерно от 50 мг примерно до 100 мг/кг массы тела.

[0247] 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 измеренного времени удерживания и концентраций нацеливающей конструкции или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривисцеральным, интратекальным, внутриполостным, путем перфузии через катетер или путем прямой внутриклеточной инъекции. Это может осуществляться один или более раз в день, один или более раз в неделю, один или более раз в месяц и один или более раз в год.

[0248] Вышеприведенное описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления изобретения. В заявке на патент конкретно рассматриваются все комбинации и перестановки аспектов и вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

[0249] Настоящее изобретение теперь в целом описано, оно будет более понятно с помощью ссылок на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом.

Пример 1. Анализ цитотоксичности первичных НК-клеток человека:

[0250] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и готовили для выделения НК-клеток. НК-клетки выделяли с использованием метода отрицательной селекции с магнитными микросферами, чистота выделенных НК-клеток обычно составляла $> 90\% \text{ CD3}^+ \text{ CD56}^+$. Выделенные НК-клетки оставляли в течение ночи, покоящиеся НК-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

Анализ цитотоксичности DELFIA:

[0251] Линии опухолевых клеток человека, экспрессирующие HER2, собирали из культуры, клетки промывали HBS и ресуспендировали в питательной среде до концентрации $10^6/\text{мл}$ для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки промывали 3 раза HBS и ресуспендировали при $0,5-1,0 \times 10^5/\text{мл}$ в культуральной среде. Для приготовления фоновых лунок отбирали аликвоту меченых клеток, и клетки извлекали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех экземплярах, чтобы не повредить осажденные клетки. 100 мкл клеток, меченных BATDA, добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Лунки предохраняли от спонтанного высвобождения из клеток-мишеней, и лунки были подготовлены для максимального лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Triton-X. Моноклональные антитела или TriNKET против HER2 (A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб (содержащий HER2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), связанный с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc, представленный SEQ ID NO: 140); и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, включающий часть тяжелой

цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи ADI-27749 (A49) (SEQ ID NO: 94) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98) и константный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи соединен с CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом (часть тяжелой цепи, представленная как аминокислотная последовательность VH-CH1-Fc, представленная в SEQ ID NO: 141), разводили в культуральной среде и в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенного mAb или TriNKET. Покоящиеся NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при 10^5 - $2,0 \times 10^6$ /мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. 50 мкл NK-клеток добавляли в каждую лунку планшета, чтобы получить в общей сложности 200 мкл культурального объема. Планшет инкубировали при 37 (C с 5% CO₂ в течение 2-3 часов, прежде чем проводить анализ.

[0252] После культивирования в течение 2-3 часов планшет извлекали из инкубатора, и клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут. 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и 200 мкл раствора европия при комнатной температуре добавляли в каждую лунку. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывался с использованием приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: %Специфического лизиса = ((Экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(Максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение))x100%.

Долгосрочный анализ цитотоксичности PBMC человека:

[0253] Клетки SkBr-3, стабильно экспрессирующие NucLight Green, были получены с использованием реагента IncuCyte NucLight Green Reagent (№ по каталогу 4475). Клетки, экспрессирующие NucLight Green, отбирали на пуромидине для получения гомогенной популяции. SkBr-3-NucLight Green клетки поддерживали в питательной среде, содержащей пуромидин, перед использованием в анализах. Клетки-мишени SkBr-3-NucLight Green получали для анализа цитотоксичности следующим образом.

[0254] Клетки, экспрессирующие NucLight Green, собирали из культуры и промывали для удаления остатков селективного антибиотика, клетки ресуспендировали в свежей культуральной среде и высевали в 96-луночный плоскодонный планшет. Планшет помещали в IncuCyte S3 на ночь для мониторинга прикрепления и роста клеток. На следующий день PBMC человека выделяли с использованием центрифугирования в градиенте плотности и готовили разведения A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб или mAb в среде для первичной культуры клеток. К клеткам SkBr-3-NucLight Green добавляли разбавленные A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб и mAb, а затем свежевыделенные PBMC. Затем планшет возвращали в IncuCyte S3.

[0255] Сбор изображений был настроен на IncuCyte S3. Изображения для фазового и зеленого каналов собирали каждый час, по 2 изображения на лунку. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения IncuCyte S3. Шаблоны для зеленого канала были созданы для подсчета количества опухолевых клеток SkBr-3.

Процентный рост рассчитывали следующим образом: % роста = ((время подсчета зеленых объектов X)/(нулевое время подсчета зеленых объектов))x100%.

[0256] ФИГ. 3, ФИГ. 4 и ФИГ. 5 демонстрируют TriNKET-опосредованное уничтожение трех клеточных линий с разными уровнями экспрессии HER2. TriNKET обеспечивает более эффективное и более сильное максимальное уничтожение всех линий HER2-положительных клеток по сравнению с трастузумабом, моноклональным антителом против HER2.

[0257] ФИГ. 3 демонстрирует NK-опосредованный лизис клеток линии 786-О опухолевых клеток человека HER2 1+. Трастузумаб проявляет небольшую активность против клеточных линий HER2 1+, увеличивая специфический лизис немного выше, чем фоновое уничтожение. Однако A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб (содержащий HER2-связывающий scFv (SEQ ID NO: 139), связанный с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv-Fc представлен SEQ ID NO: 140); и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи ADI-27749 (A49) (SEQ ID NO: 94) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 98) и константный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи соединен с доменом CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом (часть тяжелой цепи, представленная как VH-CH1-Fc, набор аминокислотных последовательностей в SEQ ID NO: 141)) и A44-F3'-KiH-TriNKET-Трастузумаб (содержащий HER2-связывающий scFv, содержащий SEQ ID NO: 139, связанный с Fc-доменом через шарнир, содержащий Ala-Ser (scFv- Fc, представленный SEQ ID NO: 146), и NKG2D-связывающий Fab-фрагмент, включающий часть тяжелой цепи, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи ADI-27744 (A44) (SEQ ID NO: 86) и домен CH1, и часть легкой цепи, содержащую вариабельный домен легкой цепи (SEQ ID NO: 90) и константный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи соединен с доменом CH1, а домен CH1 соединен с Fc-доменом (часть тяжелой цепи, представленная как VH-CH1-Fc, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 148)), были более эффективны в отношении направленного воздействия на клетки 786-О, показывая более высокий специфический лизис, чем моноклональные антитела.

[0258] ФИГ. 4 демонстрирует NK-опосредованный лизис клеток линии опухолевых клеток человека H661 с более высоким уровнем экспрессии HER2, чем у клеточной линии 786-О (обозначенная как HER2 ++). По сравнению с клеточной линией 786-О трастузумаб показал улучшенное уничтожение в отношении клеток-мишеней H661 с более высоким уровнем экспрессии HER2. Несмотря на улучшенный лизис, опосредованный трастузумабом, A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб все еще показывал превосходный лизис клеток-мишеней H661 как по эффективности, так и по максимальному уничтожению.

[0259] ФИГ. 5 демонстрирует NK-опосредованный лизис линии опухолевых клеток SkBr-3 с наивысшим уровнем экспрессии HER2 среди трех протестированных линий клеток (обозначенных как HER2+++). Трастузумаб показал повышенную эффективность в отношении клеток SkBr-3 по сравнению с линиями клеток HER2+ и HER2++, но A49-F3'-

TriNKET-трастузумаб по-прежнему демонстрировал более высокую эффективность и максимальное уничтожение.

[0260] ФИГ. 6 и ФИГ. 7 демонстрируют влияние TriNKET или mAb на 72-часовые совместные культуры РВМС человека и клеток-мишеней SkBr-3 HER2+. Клетки SkBr-3 пролиферировали примерно 3-кратно за 72-часовой период при культивировании без эффекторных РВМС. Изменчивость доноров была очевидна в эффекторных РВМС. Когда РВМС добавляли к культурам SkBr-3, рост клеток-мишеней SkBr-3 был номинально снижен (ФИГ. 6). В другом эксперименте добавление эффекторных клеток РВМС оказало незначительное влияние на рост клеток SkBr-3 (ФИГ. 7). Когда трастузумаб был добавлен к совместной культуре, эффекторные РВМС имели повышенную способность лизировать клетки-мишени SkBr-3, что показано как уменьшение % роста на ФИГ. 6 и ФИГ. 7. Когда к совместной культуре добавляли A49-F3'-TriNKET-трастузумаб (ФИГ. 6 и ФИГ. 7) и A44-F3'-KiH-TriNKET-трастузумаб (ФИГ. 7), эффекторные РВМС были еще более эффективными в лизирование клеток-мишеней SkBr-3 по сравнению с трастузумабом, что приводило к более быстрому и полному снижению количества клеток SkBr-3.

Пример 2 - Связывание TriNKET в цельной крови человека

[0261] В каждую пробирку/лунку добавляли 100 мкл гепаринизированной цельной крови человека. Триспецифические связывающие белки (TriNKET) или моноклональные Ab (mAb) добавляли непосредственно в цельную кровь, и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Для обнаружения немеченых TriNKET/mAb кровь промывали 3 раза после инкубации с TriNKET. К образцам добавляли непосредственно меченые иммунофенотипирующие mAb и вторичные антитела, специфичные к трастузумабу. После 20-минутной инкубации к каждому образцу добавляли 2 мл 1х раствора для лизиса/фиксации эритроцитов на 15 минут при комнатной температуре (RT), затем образцы промывали для удаления эритроцитов (RBC). После промывки образцы ресуспендировали для анализа FACS.

[0262] Связывание A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб сравнивали с контрольными образцами трастузумаба и вторичных антител. ФИГ. 8A-8F демонстрируют связывание A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб (NKG2D-связывающий домен из клона ADI-27749; и HER2-связывающий scFv, содержащий SEQ ID NO: 139, полученный из моноклонального антитела трастузумаба) в цельной крови человека. Связывание A49-F3'-TriNKET-трастузумаба в цельной крови человека было таким же, как у трастузумаба. A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб и трастузумаб продемонстрировали минимальное связывание со всеми популяциями иммунных клеток в крови. Небольшие сдвиги наблюдались для трастузумаба и A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб как в популяциях В-клеток, так и в популяциях моноцитов по сравнению с вторичными контрольными образцами. Связывание, наблюдаемое на В-клетках и моноцитах, вероятно, можно отнести к взаимодействиям FcR, а не к Fab-специфичности.

Пример 3 - Оценка связывания A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб с кардиомиоцитами человека по сравнению с опухолевыми клетками человека,

экспрессирующими HER2 на различном уровне:

[0263] Кардиомиоциты человека, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Cellular Dynamics/Fuji Film), опухолевые клетки 786-О, H661 и SKBR3, использовали для оценки связывания A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб с этими клетками. Клеточная линия почечно-клеточной карциномы человека 786-О экспрессирует HER2 на низком уровне, клеточная линия рака легких человека H661 экспрессирует HER2 на умеренном уровне, тогда как линия клеток рака молочной железы человека SKBR3 экспрессирует HER2 на высоком уровне. TriNKET разбавляли до $3,8 \times 10^{-4}$ до 100 мкг/мл, и эти разведения использовали в качестве окрашивания первичных антител. Связывание TriNKET детектировали с помощью конъюгированного с флуорофором вторичного антитела против человеческого IgG. Клетки анализировали методом проточной цитометрии. Интенсивность связывания флуоресценции (MFI) с клетками, экспрессирующими HER2, нормализовали для клеток, окрашенных контрольным (неспецифическим) TriNKET, для получения значений кратного превышения над фоном (FOB).

Анализ цитотоксичности PBMC человека

[0264] PBMC выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Клетки-мишени SKBR3 были помечены BacMam 3.0 NucLight Green (№ 4622) для отслеживания клеток-мишеней. При мечении клеток-мишеней SKBR3 соблюдали протокол производителя. Кардиомиоциты человека были не мечеными. Моноклональные антитела или TriNKET разводили в питательной среде. 50 мкл TriNKET и человеческих PBMC добавляли в лунки 96-луночного планшета, уже содержащего клетки-мишени, добавляли 50 мкл полной культуральной среды до общего объема культуры 200 мкл.

[0265] Сбор изображений был настроен на IncuCyte S3. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения IncuCyte S3. Шаблоны для зеленого канала были созданы для подсчета количества опухолевых клеток. Конфлюэнтность кардиомиоцитов в фазовом канале использовалась для оценки жизнеспособности клеток и расчета % гибели.

[0266] A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб связывается с кардиомиоцитами человека в той же степени, что и связывание с клетками H661. ФИГ. 9 демонстрирует связывание A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб с человеческими кардиомиоцитами, опухолевыми клетками SKBR3, H661 и 786-О, где связывание с кардиомиоцитами аналогично связыванию с клетками H661 (средний уровень поверхностной экспрессии HER2).

Анализ цитотоксичности первичных PBMC человека

[0267] ФИГ. 9А-9С и ФИГ. 11А-11В демонстрируют уничтожение клеток SKBR3 человеческими PBMC в присутствии A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, при этом жизнеспособность кардиомиоцитов затрагивается минимально.

[0268] ФИГ. 10А демонстрирует опосредованное A49-F3'-TriNKET-трастузумаб уничтожение человеческими PBMC опухолевых клеток SKBR3; ФИГ. 10В демонстрирует,

что A49-F3'-TriNKET-трастузумаб не убивал незлокачественные здоровые кардиомиоциты после 3 дней совместного культивирования при соотношении РВМС к клеткам-мишеням (Е:Т) 1:1.

[0269] ФИГ. 11А демонстрирует опосредованное A49-F3'-TriNKET-трастузумаб уничтожение человеческими РВМС опухолевых клеток SKBR3; ФИГ. 11В демонстрирует, что A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб не убивал незлокачественные здоровые кардиомиоциты после 3 дней совместного культивирования при Е:Т 20:1.

Пример 4 - TriNKET запускают CD8+ Т-клеточный лизис ТАА+ опухолевых клеток

Анализ цитотоксичности первичных CD8 Т-клеток человека: генерация первичных эффекторных CD8 Т-клеток человека

[0270] Человеческие РВМС выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные РВМС стимулировали конканавалином А (ConA) с концентрацией 1 мкг/мл при 37°C в течение 18 часов. Затем ConA удаляли и культивировали с 25 ед./мл IL-2 при 37°C в течение 4 дней. CD8+ Т-клетки очищали методом отрицательной селекции с помощью магнитных микросфер, затем культивировали в среде, содержащей 25 ед./мл IL-2 или 10 нг/мл IL-15, при 37°C в течение 8-10 дней. CD8+ Т-клетки очищали методом отрицательной селекции с помощью магнитных микросфер, затем культивировали в среде, содержащей 25 ед./мл IL-2 или 10 нг/мл IL-15, при 37°C в течение 8-10 дней.

[0271] Образованные выше эффекторные CD8+ Т-клетки человека анализировали с помощью проточной цитометрии на чистоту CD8+ Т-клеток, а также экспрессию NKG2D и CD16. Клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором антителами против CD3, CD8, NKG2D, CD16 и анализировали проточной цитометрией.

Краткосрочный анализ цитотоксичности эффекторных CD8 Т-лимфоцитов DELFIA

[0272] Линию опухолевых клеток человека SkBr-3, экспрессирующую интересующую мишень, HER2, собирали из культуры. Клетки промывали и ресуспендировали в ростовой среде при концентрации 10^6 /мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки трижды промывали HBS и ресуспендировали при $0,5 \times 10^5$ /мл в культуральной среде. 100 мкл клеток, меченных BATDA, добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Лунки предохраняли от спонтанного высвобождения из клеток-мишеней, и лунки были подготовлены для максимального лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Triton-X.

[0273] Моноклональные антитела, TriNKET и контроли разводили в питательной среде; В каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb/TriNKET. Эффекторные CD8 Т-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при 5×10^6 /мл в культуральной среде (соотношение Е:Т=50:1). Затем в каждую лунку планшета добавляли 50 мкл CD8 Т-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет

инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2-3 часов перед осуществлением анализа. После инкубации планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут. Затем 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Планшет считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: %Специфического лизиса = ((Экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(Максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение))x100%.

Долгосрочный анализ цитотоксичности эффекторных CD8 Т-лимфоцитов Incucyte

[0274] Линия опухолевых клеток человека SkBr-3, экспрессирующая представляющую интерес мишень, HER2, была помечена VacMam 3.0 NucLight Green (# 4622) для отслеживания клеток-мишеней. Клетки-мишени SkBr-3 собирали из культуры, промывали, ресуспендировали в питательной среде и высевали по 5000 на лунку в 96-луночный планшет. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение ночи. Моноклональные антитела, TriNKET и контроли разводили в питательной среде; В каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb или TriNKET. Эффекторные CD8 Т-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при концентрации 1×10⁶/мл в культуральной среде (соотношение Е:Т=10:1). Затем в каждую лунку планшета добавляли 50 мкл CD8⁺ Т-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ до 7 дней. Сбор изображений был настроен на IncuCyte S3. Изображения для фазового и зеленого каналов собирали каждый час, по 2 изображения на лунку. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения IncuCyte S3. Количество зеленых объектов/на лунку использовали для измерения количества живых опухолевых клеток.

Характеристика эффекторных CD8 Т-клеток, используемых в анализе цитотоксичности

[0275] CD8⁺ Т-клетки, полученные при стимуляции соnА и культивированные с IL-15, имели высокую чистоту (99% CD3⁺ CD8⁺ клеток), и все экспрессировали NKG2D, но не CD16 (ФИГ. 12А-12С). Аналогичные результаты наблюдаются с CD8⁺ Т-клетками, созданными с помощью культивирования с IL-2.

Краткосрочный анализ цитотоксичности эффекторных CD8 Т-лимфоцитов DELFIA

[0276] Оценивали влияние А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб на цитотоксическую активность первичных CD8⁺ Т-клеток человека после культивирования с IL-15. А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб усиливал цитотоксическую активность первичных CD8⁺ Т-клеток человека после культивирования с IL-15 дозозависимым образом (ФИГ. 13А). А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб также усиливал цитотоксическую активность первичных CD8⁺ Т-

клеток человека после культивирования с IL-2 (ФИГ. 13B).

[0277] Маргетуксимаб или Герцептин не показали эффектов, наблюдаемых при применении A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб.

Долгосрочный анализ цитотоксичности эффекторных CD8 Т-лимфоцитов Incucyte

[0278] Клетки SkBr-3, культивированные отдельно или совместно с CD8+ Т-клетками, пролиферировали в культуре (ФИГ. 14A). Когда клетки обрабатывали A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб, рост SkBr-3 демонстрировал некоторое ингибирование из-за блокады сигнала HER2 (ФИГ. 14A). В присутствии антитела против CD3 (антитело mIgG1, перекрестно связанное с F(ab')₂ с антителом против mIgG1) (ФИГ. 14A), добавление A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб к совместной культуре SkBr-3 клеток и CD8 Т-клеток показало гораздо большее ингибирование роста опухолевых клеток, чем один A49-F3'-TriNKET-трастузумаб, что указывает на то, что A49-F3'-TriNKET-трастузумаб усиливает цитотоксичность CD8+ Т-клеток. Когда Т-клетки не активировались антителом против CD3, добавление CD8+ Т-клеток не приводило к дальнейшему подавлению роста клеток, что указывает на то, что способность A49-F3'-TriNKET-трастузумаб усиливать цитотоксичность CD8+ Т-клеток зависит от активации Т-клеток антителом против CD3 (ФИГ. 14B).

Пример 5 - Оценка связывания TriNKET с опухолевыми антигенами человека, экспрессируемыми клетками

Анализ связывания TriNKET

[0279] Линии опухолевых клеток человека, экспрессирующие HER2, использовали для оценки связывания с опухолевым антигеном TriNKET (A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) и с моноклональными антителами. Клеточная линия почечно-клеточной карциномы человека 786-О экспрессировала HER2 на низком уровне, клеточная линия рака легких человека NCI-H661 экспрессировала HER2 на умеренном уровне, а клеточная линия рака молочной железы человека SkBr-3 экспрессировала HER2 на высоком уровне. Все три клеточные линии использовали для оценки их аффинности связывания с TriNKET. TriNKET разводили в серии концентраций и инкубировали с соответствующими клетками.

[0280] Связывание TriNKET (A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) с клетками детектировали с использованием флуорофора, конъюгированного со вторичным антителом против человеческого IgG, и клетки анализировали проточной цитометрией. Уровень связывания при каждой концентрации TriNKET (A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб) рассчитывали как процентное значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) клеток относительно максимального MFI, наблюдаемого для клеток, инкубированных с 670 нМ TriNKET. Альтернативно, уровень связывания при каждой концентрации TriNKET рассчитывали как кратное превышение фонового (FOB) значения MFI клеток относительно фонового MFI, наблюдаемого для клеток, инкубированных только с вторичным антителом. В каждом эксперименте вместо TriNKET использовали

трастузумаб в качестве контроля.

[0281] Как показано на ФИГ. 15А-15В, 16А-16В и 17А-17В, TriNKET (А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб) и трастузумаб показали наиболее сильное связывание с клетками SkBr-3 (ФИГ. 15А), которые имели высокий уровень экспрессии HER2 (HER+++). Аффинность связывания HER2-нацеленного TriNKET и трастузумаба с NCI-H661, который имеет умеренный уровень экспрессии HER2 (HER2++), была похожа (ФИГ. 16А), но немного выше, чем аффинность связывания с клетками 786-О (ФИГ. 17А), которые имели низкий уровень экспрессии HER2 (HER2+). Этот результат предполагает, что аффинность HER2-нацеленного TriNKET и трастузумаба к HER2-экспрессирующим клеткам обычно коррелирует с уровнем экспрессии HER2 на клетках.

[0282] Трастузумаб продемонстрировал более высокую аффинность связывания, чем TriNKET (А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб) с каждой из трех клеточных линий (SkBr-3 (ФИГ. 15А), NCI-H661 (ФИГ. 16А) и 786-О (ФИГ. 17А)). Однако при выражении в виде значений кратного превышения относительно фона (FOB) максимальное связывание TriNKET с каждой из трех клеточных линий было больше, чем максимальное связывание трастузумаба (SkBr-3 (ФИГ. 15В), NCI-H661 (ФИГ. 16В) и 786-О (ФИГ. 17В)). Различие было особенно значительным для клеток SkBr-3, которые имели высокий уровень экспрессии HER2 (ФИГ. 15В).

[0283] Аффинность TriNKET к клеткам EL4, экспрессирующим NKG2D, измеряли аналогичным методом. Как показано на ФИГ. 18А-18В, разные NKG2D-нацеливающие домены, используемые в TriNKET, приводили к различным уровням связывания с NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4. TriNKET клонов А44, F63 и E79 сильно связывается с NKG2D (фиг. 18А и фиг. 18В), тогда как TriNKET клона А49 связывается с NKG2D слабо (фиг. 18А и фиг. 18В).

Анализ цитотоксичности первичных НК-клеток человека

[0284] РВМС выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности и промывали. НК-клетки выделяли из РВМС с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных микросфер. Как правило, при использовании этого метода более 90% собранных клеток были $CD3^+CD56^+$. Выделенные НК-клетки оставляли на ночь. На следующий день покоящиеся НК-клетки использовали в анализах цитотоксичности.

Анализ цитотоксичности DELFIA

[0285] Линии опухолевых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры. Клетки промывали HBS и ресуспендировали в питательной среде при концентрации 10^6 клеток/мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки трижды промывали HBS и ресуспендировали в культуральной среде при $0,5-1,0 \times 10^5$ /мл. 100 мкл клеток, меченных BATDA, добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Трастузумаб А49- $F3'$ -TriNKET-Трастузумаб разводили в культуральной среде и 50 мкл разбавленного трастузумаба и А49- $F3'$ -

TriNKET-Трастузумаб наносили, соответственно, в каждую из соответствующих лунок для эксперимента. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры. Клетки промывали и ресуспендировали при концентрации 10^5 - $2,0 \times 10^6$ /мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. В каждую лунку планшета добавляли 50 мкл NK-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Для измерения спонтанного высвобождения продукта гидролиза BATDA (например, из-за спонтанной гибели клеток) к клеткам-мишеням не добавляли NK-клетки, mAb или TriNKET. Чтобы измерить максимальное высвобождение продукта гидролиза BATDA, клетки-мишени лизировали добавлением 1% Triton-X. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2-3 часов.

[0286] После культивирования в течение 2-3 часов планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Уровни флуоресценции считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X.

[0287] Процент специфического лизиса рассчитывали как: % специфического лизиса = (экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение) x 100%

[0288] Чтобы имитировать связывающие свойства TriNKET на отдельных молекулах, биспецифические антитела, связывающиеся с NKG2D и HER2, комбинируют с трастузумабом и сравнивают с TriNKET, содержащим все три связывающих домена на одной молекуле. Соответственно, клетки-мишени 786-О и H661 инкубировали с выделенными NK-клетками в присутствии TriNKET, нацеленного на HER2, трастузумаба, Fc-молчащего TriNKET (включая SEQ ID NO: 156 и SEQ ID NO: 157, каждая из которых включает замены L234A, L235A и P329G (LALAPG) в Fc-домене (показаны в квадратных скобках [])) или комбинация Fc-молчащего TriNKET и трастузумаба. Примечательно, что TriNKET демонстрирует значительное преимущество в эффективности и максимальном лизисе клеток-мишеней по сравнению с комбинацией Fc-молчащих TriNKET и трастузумаба, когда клетки-мишени представляют собой клетки 786-О (ФИГ. 19) или клетки H661 (ФИГ. 20).

scFv-Fc

(Включает замены L234A, L235A и P329G (LALAPG) (показаны в квадратных скобках []))

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLE
WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG
FYAMDYWGQGTLLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPE[AA]GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL[G]
APIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:156)

Цельная цепь VH-CH1-Fc

(Включает замены L234A, L235A и P329G (LALAPG) (показаны в квадратных скобках []))

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSS
SYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPW
GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPE[AA]GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL[G]APIEKTISKAKG
QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSD
GSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:157)

Пример 6 - Варианты ADI-27749 и TriNKET, содержащие варианты

[0289] Как описано выше, ADI-27749 (A49) содержит, среди прочего, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO: 169). Met в положении 102 SEQ ID NO: 94 (то есть в положении 4 этой последовательности CDR3) может быть заменен на Gln, Leu, Ile, Phe или Val, тем самым создавая сайты связывания NKG2D A49MQ, A49ML, A49MI, A49MF, и A49MV, соответственно, имеющие соответствующие последовательности вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи и CDR, представленные в Таблице 1.

[0290] Связывание A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб («TriNKET А») и мутантной формы TriNKET А, имеющей замену Ile на Met («TriNKET А*»), со слитым белком NKG2D человека и Fc мыши («mFc-hNKG2D») охарактеризовывали поверхностным плазмонным резонансом (SPR) при 37 °С. Связывание A49-F3'-TriNKET-Трастузумаб («TriNKET А») и мутантной формы TriNKET А, имеющей замену Ile на Met («TriNKET А*»), со слитым белком NKG2D человека и Fc мыши («mFc-hNKG2D») охарактеризовывали поверхностным плазмонным резонансом (SPR) при 37 °С. Были рассчитаны константы равновесной аффинности, и данные двух независимых экспериментов для TriNKET А* и независимых экспериментов для TriNKET А были усреднены.

Таблица 12		
Захват	Аналит	K_D (M) равновесная константа аффинности
mFc-hNKG2D	TriNKET А*	5,09×10 ⁻⁷
mFc-hNKG2D	TriNKET А*	4,54×10 ⁻⁷

Среднее		$4,81 \times 10^{-7}$
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$3,70 \times 10^{-7}$
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$3,28 \times 10^{-7}$
mFc-hNKG2D	TriNKET A	$3,13 \times 10^{-7}$
Среднее$\pm$stdev		$(3,37 \pm 0,30) \times 10^{-7}$

[0291] Как показано в Таблице 12, равновесная константа аффинности (KD), полученная в результате аппроксимации аффинности, была очень похожей между репликами, что свидетельствует о высокой достоверности измеренных параметров. Значения KD показали, что вариант M102 имеет менее чем 2-кратное снижение аффинности к человеческому NKG2D по сравнению с TriNKET A. KD для TriNKET A* составляла $(4,81 \pm 0,39) \times 10^{-7}$ М, тогда как KD для TriNKET A составляла $(3,37 \pm 0,30) \times 10^{-7}$ М (рассчитано по аппроксимации аффинности). Эти значения KD предполагают, что мутация M102 оказывает лишь незначительное влияние на связывание A49-содержащего TriNKET с человеческим NKG2D.

[0292] Кроме того, влияние мутации M102 на эффективность TriNKET оценивали с помощью анализа цитотоксичности. Вкратце, клетки KHYG-1, экспрессирующие высокоаффинный вариант CD16a (158V), были получены посредством ретровирусной трансдукции. После трансдукции клетки отбирали в ростовой среде, содержащей пуромицин, для создания выбранной популяции клеток KHYG-1-CD16V. Отобранную популяцию поддерживали в среде, содержащей 10 нг/мл человеческого IL-2. 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.

[0293] Для измерения активности TriNKET A и TriNKET A* в качестве клеток-мишеней была выбрана линия опухолевых клеток человека SKBR-3, экспрессирующая опухолевый антиген HER2. SKBR-3, экспрессирующий HER2, собирали из культуры. Клетки промывали забуференным физиологическим раствором Нерес (HBS) и ресуспендировали в ростовой среде при концентрации 10^6 клеток/мл для мечения BATDA (гидрофобная этерифицированная форма TDA (бис(ацетоксиметил)2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоксилат) (Perkin Elmer C136-100) (BATDA диффундирует через клеточную мембрану жизнеспособных клеток и гидролизуются внутриклеточными эстеразами, что приводит к накоплению проникаемых для мембран TDA внутри клеток-мишеней. После инкубации клеток-мишеней с эффекторными клетками TDA, высвобожденный из лизированных клеток в супернатант, хелатируется с Eu^{3+} , и активность NK-клеток оценивается количественно путем измерения интенсивной флуоресценции образовавшегося хелата EuTDA . (См. Blomberg et al. J. Immunol. Methods (1996) 193(2):199-206)). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки трижды промывали HBS и ресуспендировали в культуральной среде при $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. 100 мкл BATDA-меченных клеток добавляли в каждую

лунку 96-луночного планшета.

[0294] TriNKET серийно разводили в культуральной среде и в каждую лунку добавляли 50 мкл разбавленного TriNKET. Покоящиеся NK-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде. 50 мкл NK-клеток добавляли в каждую лунку планшета для достижения желаемого соотношения Е:Т 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.

[0295] После культивирования планшет вынимали из инкубатора, и клетки осаждали центрифугированием при 200xg в течение 5 минут. 20 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем. Супернатант из культуры меченых клеток, инкубированных отдельно без NK-клеток, использовали для измерения спонтанного высвобождения усиливающего флуоресценцию лиганда 2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоновой кислоты (TDA) (см. Blomberg et al. J. Immunol. Methods (1996) 193(2):199-206). Супернатант из культуры меченых клеток, инкубированных с 1% Тритоном-X, использовали для измерения максимального лизиса клеток-мишеней. Супернатант из культуры меченых клеток до 2-3 часов инкубации использовали для измерения фона и в целях контроля качества.

[0296] 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 для планшетов при 250 об/мин в течение 15 минут. Флуоресценцию измеряли с помощью прибора SpectraMax i3X. Уровни флуоресценции представляли лизис клеток-мишеней. Значения % специфического лизиса рассчитывали как: % специфического лизиса = ((Экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(Максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение))×100%.

[0297] Значения % специфического лизиса нанесены на график на ФИГ. 21, а значения EC₅₀ и максимального % специфического лизиса приведены в Таблице 13.

Таблица 13		
Белок	EC ₅₀ (нМ)	Макс. лизис (%)
TriNKET A	0,39	35
TriNKET A*	0,65	36

[0298] EC₅₀ была увеличена менее чем в 2 раза, а максимальный % значений специфического лизиса TriNKET A* был идентичен таковому для TriNKET A, что позволяет предположить, что мутация M102 не оказала существенного влияния на биологическую активность TriNKET A.

Пронумерованные варианты осуществления

[0299] Раскрытые в настоящем описании варианты осуществления включают варианты осуществления с P1 по P49, как предусмотрено в пронумерованных вариантах осуществления изобретения:

[0300] Вариант осуществления P1: белок, содержащий: (а) первый

антигенсвязывающий сайт, содержащий Fab-фрагмент, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который связывается с HER2; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывается с CD16.

[0301] Вариант осуществления P2: белок согласно варианту осуществления P1, отличающийся тем, что scFv связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16, через шарнир, содержащий Ala-Ser, где scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

[0302] Вариант осуществления P3: белок согласно варианту осуществления P2, отличающийся тем, что scFv связан с Fc-доменом антитела.

[0303] Вариант осуществления P4: белок согласно варианту осуществления P2 или P3, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv.

[0304] Вариант осуществления P5: белок согласно варианту осуществления P4, отличающийся тем, что дисульфидный мостик образован между C44 из вариабельного домена тяжелой цепи и C100 из вариабельного домена легкой цепи.

[0305] Вариант осуществления P6: белок согласно варианту осуществления P5, отличающийся тем, что scFv связан с Fc-доменом антитела, где вариабельный домен легкой цепи scFv расположен на N-конце вариабельного домена тяжелой цепи scFv, и связан с вариабельным доменом тяжелой цепи scFv через гибкий линкер (GlyGlyGlyGlySer)₄ ((G4S)₄) (SEQ ID NO: 203), и Fab связан с Fc-доменом антитела.

[0306] Вариант осуществления P7: белок согласно любому из вариантов осуществления P2-P6, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи scFv связан с вариабельным доменом легкой цепи scFv через гибкий линкер.

[0307] Вариант осуществления P8: белок согласно варианту осуществления P7, отличающийся тем, что гибкий линкер содержит (GlyGlyGlyGlySer)₄ ((G4S)₄) (SEQ ID NO: 203).

[0308] Вариант осуществления P9: белок согласно любому из вариантов осуществления P2-P8, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи scFv расположен на N-конце или C-конце вариабельного домена легкой цепи scFv.

[0309] Вариант осуществления P10: белок согласно варианту осуществления P9, отличающийся тем, что вариабельный домен легкой цепи scFv расположен на N-конце вариабельного домена тяжелой цепи scFv.

[0310] Вариант осуществления P11: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P10, отличающийся тем, что Fab-фрагмент связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16.

[0311] Вариант осуществления P12: белок согласно варианту осуществления P11,

отличающийся тем, что часть тяжелой цепи Fab-фрагмента содержит вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1, и где вариабельный домен тяжелой цепи связан с доменом CH1.

[0312] Вариант осуществления P13: белок согласно варианту осуществления P11 или P12, отличающийся тем, что Fab связан с Fc-доменом антитела.

[0313] Вариант осуществления P14: белок согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий последовательность SEQ ID NO: 139.

[0314] Вариант осуществления P15: белок согласно любому из вариантов осуществления P2-P14, содержащий scFv, связанный с Fc-доменом антитела, где scFv, связанный с Fc-доменом антитела, представлен последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146.

[0315] Вариант осуществления P16: белок согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий последовательность SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148.

[0316] Вариант осуществления P17: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139.

[0317] Вариант осуществления P18: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139.

[0318] Вариант осуществления P19: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139.

[0319] Вариант осуществления P20: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146.

[0320] Вариант осуществления P21: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146.

[0321] Вариант осуществления P20: белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146.

[0322] Вариант осуществления P23: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 94.

[0323] Вариант осуществления P24: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 90.

[0324] Вариант осуществления P25: белок согласно любому из вариантов

осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 90.

[0325] Вариант осуществления P26: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, связывающийся с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 98.

[0326] Вариант осуществления P27: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 98.

[0327] Вариант осуществления P28: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 144, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 98.

[0328] Вариант осуществления P29: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 144, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 98.

[0329] Вариант осуществления P30: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 90.

[0330] Вариант осуществления P31: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 98.

[0331] Вариант осуществления P32: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 144, и вариабельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 98.

[0332] Вариант осуществления P33: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13 и P23-P32, отличающийся тем, что Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2-домен человеческого антитела IgG1.

[0333] Вариант осуществления P34: белок согласно варианту осуществления P33,

отличающийся тем, что Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

[0334] Вариант осуществления P35: белок согласно варианту осуществления P33 или P34, отличающийся тем, что Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену человеческого IgG1, и отличается в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, T350., L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411, K439.

[0335] Вариант осуществления P36: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13 и P23-P34, отличающийся тем, что Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены Q347R, D399V и F405T.

[0336] Вариант осуществления P37: белок согласно варианту осуществления P36, отличающийся тем, что Fc-домен, содержащий замены, связан с scFv.

[0337] Вариант осуществления P38: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13 и P23-P34, отличающийся тем, что Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены K360E и K409W.

[0338] Вариант осуществления P39: белок согласно варианту осуществления P38, отличающийся тем, что Fc-домен, содержащий замены, связан с Fab-фрагментом.

[0339] Вариант осуществления P40: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13 и P23-P34, отличающийся тем, что Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замену T366W.

[0340] Вариант осуществления P41: белок согласно варианту осуществления P40, отличающийся тем, что Fc-домен, содержащий замену, связан с Fab-фрагментом.

[0341] Вариант осуществления P42: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P13 и P23-P34, отличающийся тем, что Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены T366S, L368A и Y407V.

[0342] Вариант осуществления P43: белок согласно варианту осуществления P42, отличающийся тем, что Fc-домен, содержащий замены, связан с scFv.

[0343] Вариант осуществления P44: белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P43, отличающийся тем, что белок связывается с NKG2D с аффинностью KD 10 нМ или ниже.

[0344] Вариант осуществления P45: композиция, содержащая белок согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[0345] Вариант осуществления P46: клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих белок, согласно любому из вариантов осуществления P1-P44.

[0346] Вариант осуществления P47: способ прямого и/или косвенного усиления гибели опухолевых клеток, при этом способ включает экспонирование опухоли и клеток-натуральных киллеров с белком согласно любому из вариантов осуществления P1-P44.

[0347] Вариант осуществления P48: способ лечения онкологического заболевания, включающий введение пациенту белка согласно любому из вариантов осуществления P1-P44 или композиции согласно варианту осуществления P45.

[0348] Вариант осуществления P49: способ согласно варианту осуществления P48, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, почечно-клеточной карциномы, аденокарциномы легкого, рака простаты, холангиокарциномы, рака матки, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака легкого, мезотелиомы, рака печени, мезотелиомы, саркомы и рака желчного пузыря.

Включение ссылкой

[0349] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящем документе, включено в качестве ссылки для всех целей.

Эквиваленты

[0350] Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах не выходя за рамки его объема или существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящем документе. Объем изобретения, таким образом, определяется с помощью формулы изобретения, а не с помощью вышеуказанного описания, и подразумевается, что все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности пунктов формулы изобретения, охвачены настоящим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, содержащий Fab-фрагмент, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который связывается с HER2; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывается с CD16.

2. Белок по п. 1, где scFv связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16, через шарнир, содержащий Ala-Ser.

3. Белок по п. 2, где scFv связан с Fc-доменом антитела.

4. Белок по любому из пп. 1-3, где scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи.

5. Белок по п. 4, где вариабельный домен тяжелой цепи scFv образует дисульфидный мостик с вариабельным доменом легкой цепи scFv.

6. Белок по п. 5, где дисульфидный мостик образуется между C44 вариабельного домена тяжелой цепи и C100 вариабельного домена легкой цепи.

7. Белок по любому из пп. 4-6, где вариабельный домен легкой цепи scFv связан с вариабельным доменом тяжелой цепи scFv через гибкий линкер.

8. Белок по п. 7, где гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143.

9. Белок по п. 8, где гибкий линкер состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143.

10. Белок по любому из пп. 4-9, где вариабельный домен легкой цепи расположен на N-конце или C-конце вариабельного домена тяжелой цепи.

11. Белок по п. 10, где вариабельный домен легкой цепи расположен на N-конце вариабельного домена тяжелой цепи.

12. Белок по любому из пп. 1-11, где Fab-фрагмент связан с Fc-доменом антитела или его частью, достаточной для связывания CD16, или с третьим антигенсвязывающим сайтом, который связывается с CD16.

13. Белок по любому из пп. 1-12, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности области 1, определяющей комплементарность, (CDR1), области 2, определяющей комплементарность, (CDR2) и области 3, определяющей комплементарность, (CDR3), представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 169, соответственно; и вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно;

(j) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 182, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно;

(k) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 185, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно; или

(l) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 168, 96 и 188, соответственно; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно.

14. Белок по любому из пп. 1-13, где первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 94.

15. Белок по любому из пп. 1-14, где первый антигенсвязывающий сайт, связывающийся с NKG2D, содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 98;

(b) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 144, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 98; или

(c) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 90.

16. Белок по любому из пп. 1-15, где первый антигенсвязывающий сайт, связывающийся с NKG2D, содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 98;

(b) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 144, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 98; или

(c) переменный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ

ID NO: 90.

17. Белок по любому из пп. 1-16, где первый антигенсвязывающий сайт, связывающийся с NKG2D, содержит:

(а) варибельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 94, и варибельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 98;

(b) варибельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 144, и варибельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 98; или

(с) варибельный домен тяжелой цепи, идентичный SEQ ID NO: 86, и варибельный домен легкой цепи, идентичный SEQ ID NO: 90.

18. Белок по любому из пп. 1-17, где белок связывается с NKG2D с K_D от 2 нМ до 120 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

19. Белок по любому из пп. 1-18, где второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит:

(а) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 115, 116 и 117, соответственно, и варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно;

(b) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 123, 124 и 125, соответственно, и варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 127, 128 и 129, соответственно; или

(с) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 131, 132 и 133, соответственно, и варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно.

20. Белок по любому из пп. 1-19, где второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит:

(а) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 195, и варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 196;

(b) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 197, и варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 198; или

(с) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 199, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 200.

21. Белок по любому из пп. 1-20, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с HER2, содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 196;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 197, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 198; или

(с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 199, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 200.

22. Белок по любому из пп. 1-21, где второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с HER2, содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 196;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 197, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 198; или

(с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 199, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 200.

23. Белок по любому из пп. 1-22, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с HER2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 171.

24. Белок по п. 23, где второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с HER2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

25. Белок по любому из пп. 1-24, где Fc-домен антитела содержит шарнирный и CH2-домен человеческого антитела IgG1.

26. Белок по п. 25, где Fc-домен антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1.

27. Белок по п. 25 или 26, где Fc-домен антитела содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную Fc-домену человеческого IgG1, и отличается в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из Q347,

Y349, T350, L351., S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411, K439.

28. Белок по любому из пп. 1-27, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены Q347R, D399V и F405T.

29. Белок по п. 28, где Fc-домен антитела, содержащий замены, связан с scFv.

30. Белок по любому из пп. 1-29, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены K360E и K409W.

31. Белок по п. 30, где Fc-домен антитела, содержащий замены, связан с Fab-фрагментом.

32. Белок по любому из пп. 1-27, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замену T366W.

33. Белок по п. 32, где Fc-домен антитела, содержащий замену, связан с Fab-фрагментом.

34. Белок по любому из пп. 1-27 и 32-33, где Fc-домен антитела представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий замены T366S, L368A и Y407V.

35. Белок по п. 34, где Fc-домен антитела, содержащий замены, связан с scFv.

36. Белок по любому из пп. 1-35, содержащий последовательность SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 148.

37. Белок по любому из пп. 1-36, где scFv, связанный с Fc-доменом антитела, представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140 или SEQ ID NO: 146.

38. Белок, содержащий:

(а) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 141;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192;
и

(с) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 142.

39. Белок по п. 38, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 140.

40. Белок, содержащий:

(а) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 141;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192;
и

(с) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 142.

41. Белок по п. 40, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 140.

42. Белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141;

(b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 192; и

(c) третий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

43. Белок по п. 42, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140.

44. Композиция, содержащая белок по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

45. Клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих белок по любому из пп. 1-43.

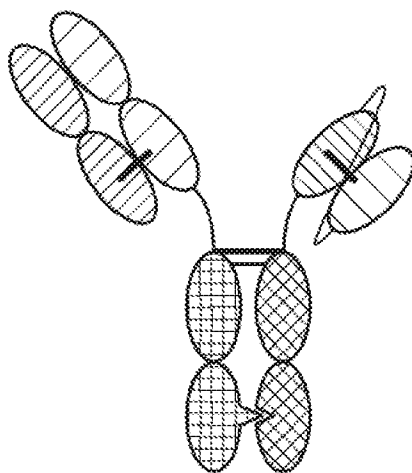
46. Способ прямого и/или косвенного усиления гибели опухолевых клеток, включающий экспонирование опухоли и клеток-натуральных киллеров с белком по любому из пп. 1-43.

47. Способ лечения онкологического заболевания, включающий введение пациенту белка по любому из пп. 1-43 или композиции по п. 44.

48. Способ по п. 47, где онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, почечно-клеточной карциномы, аденокарциномы легкого, рака предстательной железы, холангиокарциномы, рака матки, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака легкого, мезотелиомы, рака печени, мезотелиомы, саркомы и рака желчного пузыря.

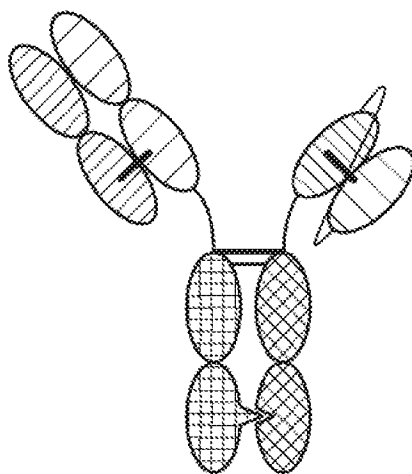
По доверенности

ФИГ. 1

FAB, нацеленный
на NK-клеткиscFv, нацеленный
на опухоль

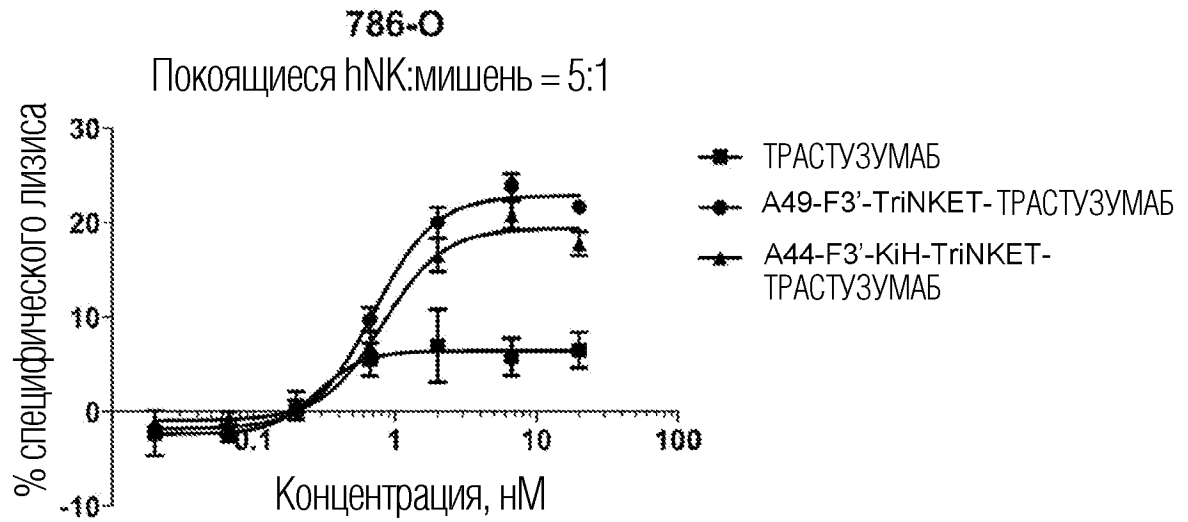
формат scFv-FAB

ФИГ. 2

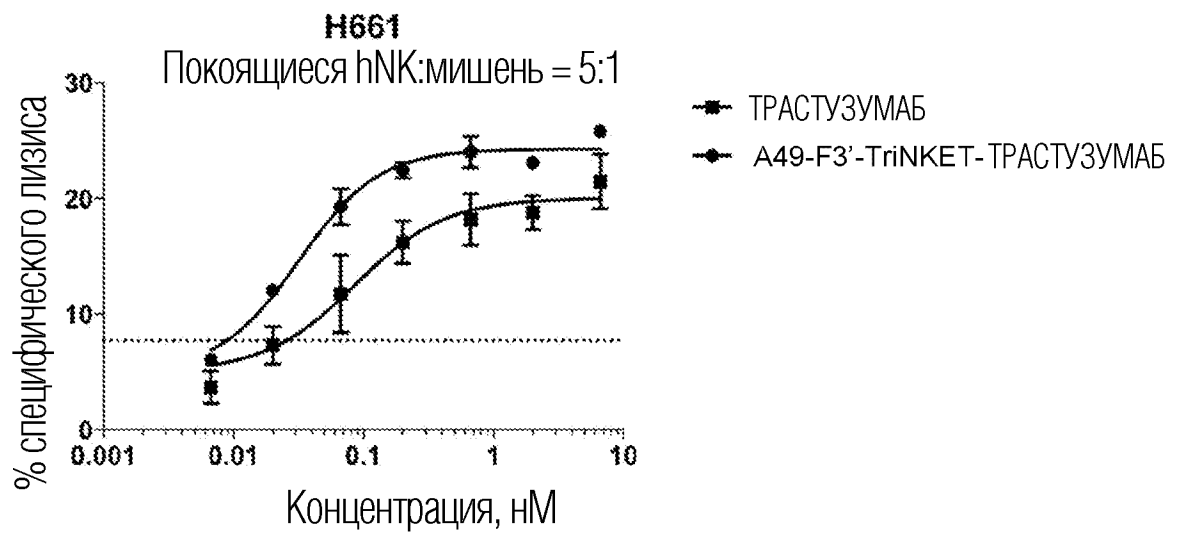
FAB, нацеленный
на NK-клеткиscFv, нацеленный
на опухоль

формат scFv-KiH

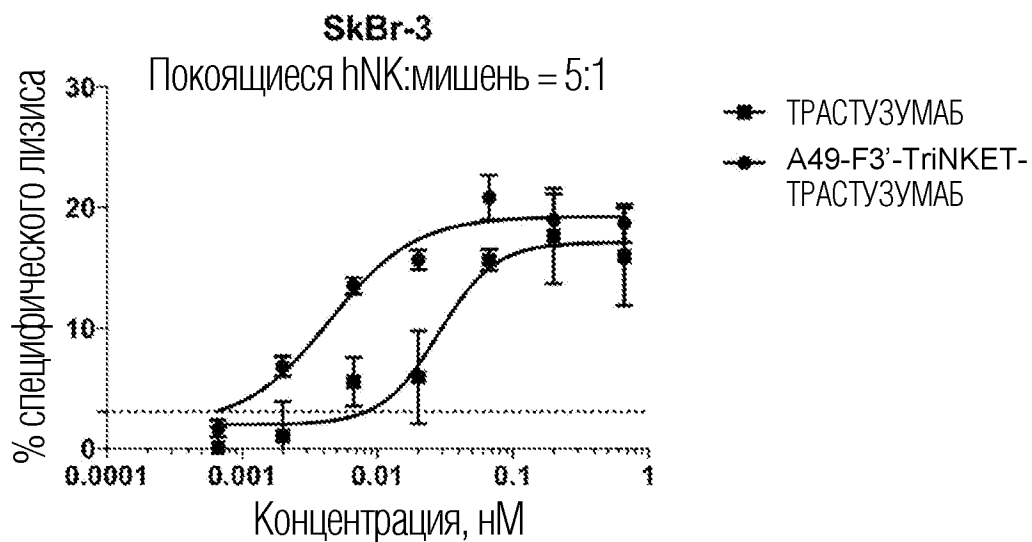
ФИГ. 3



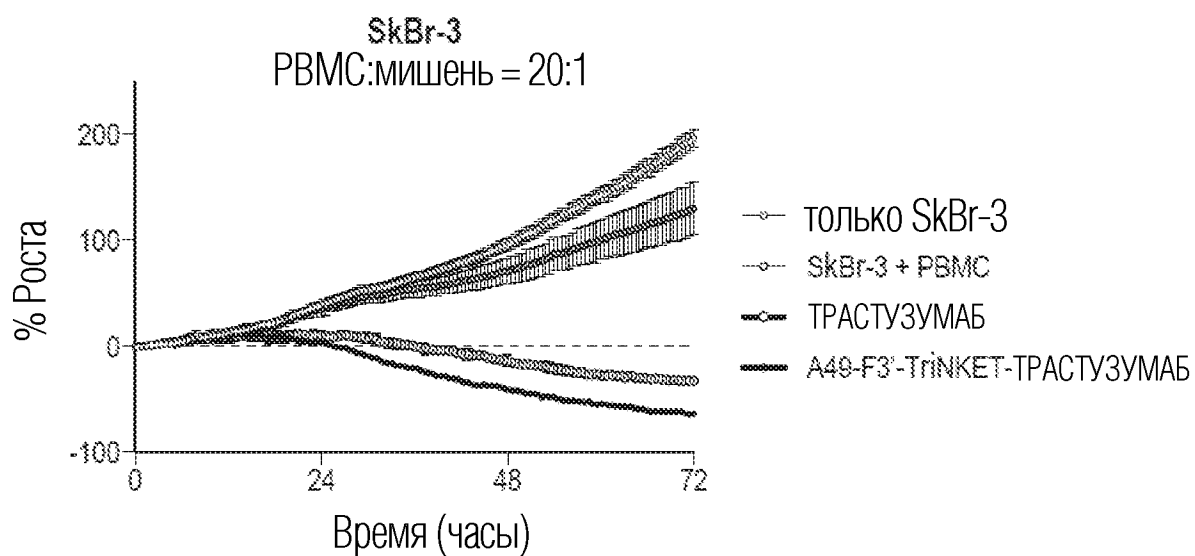
ФИГ. 4



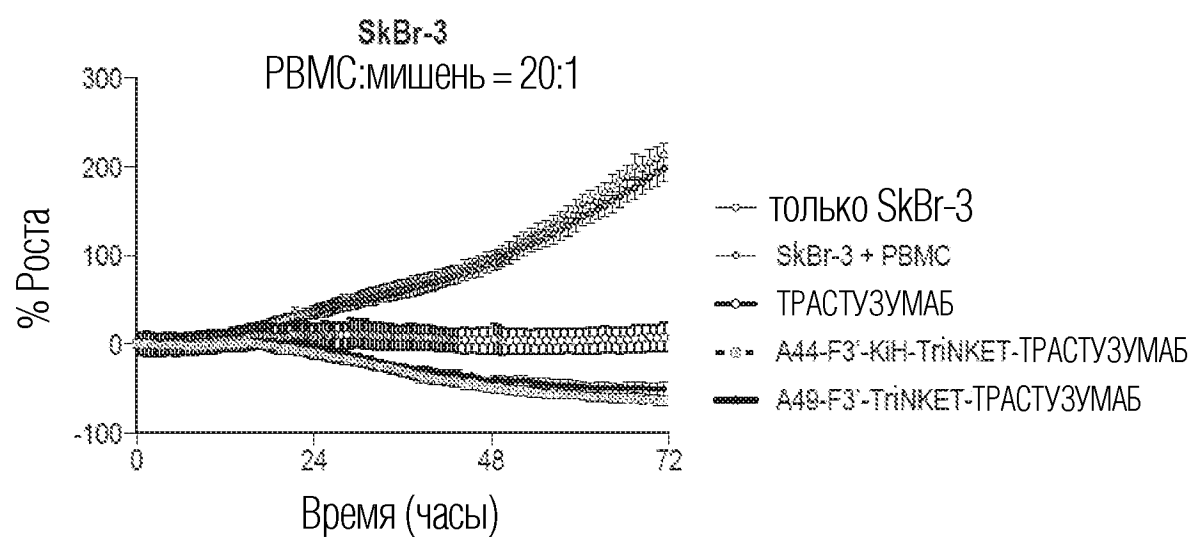
ФИГ. 5



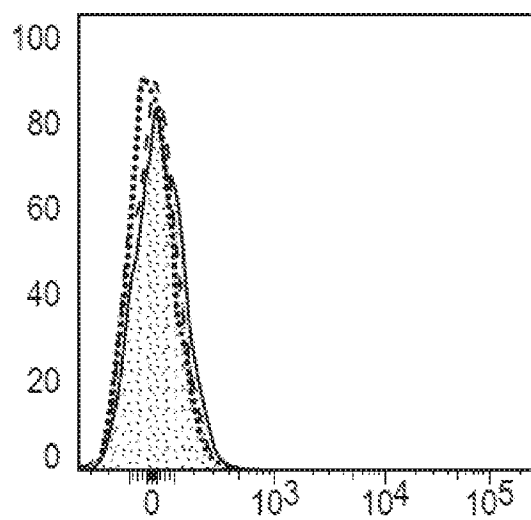
ФИГ. 6



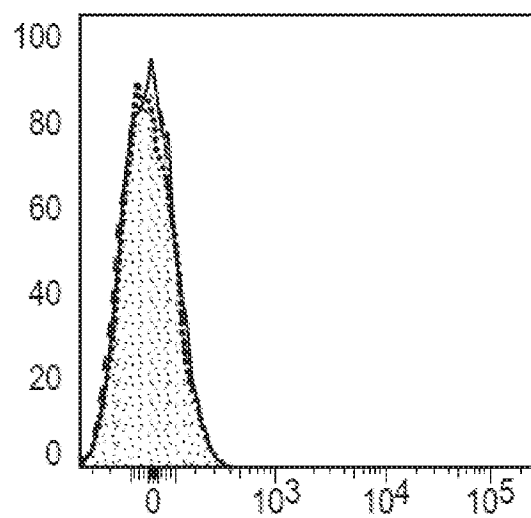
ФИГ. 7



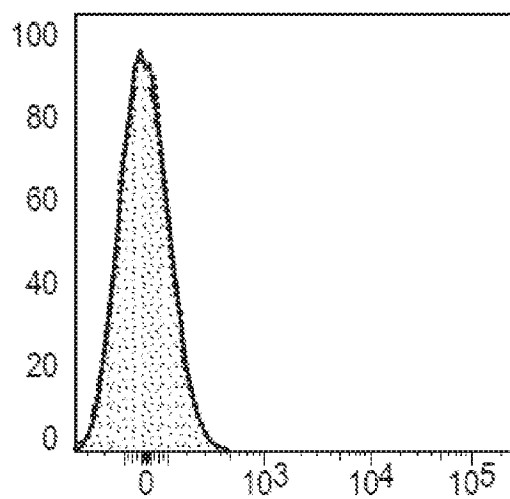
ФИГ. 8А



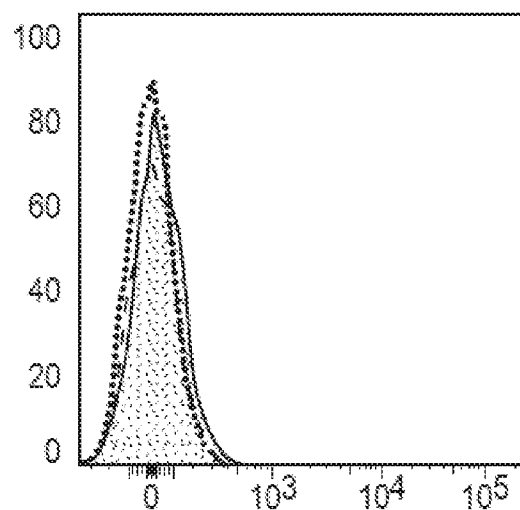
ФИГ. 8В



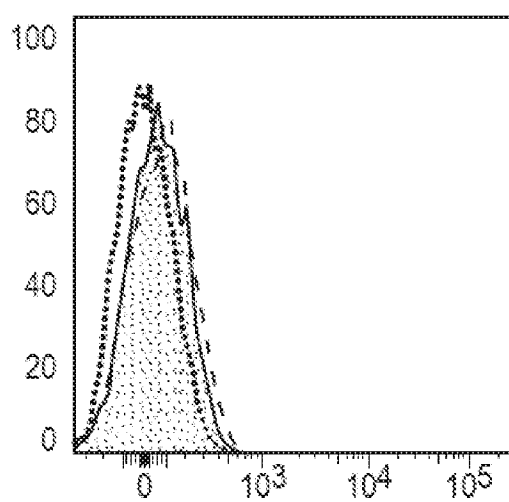
ФИГ. 8С



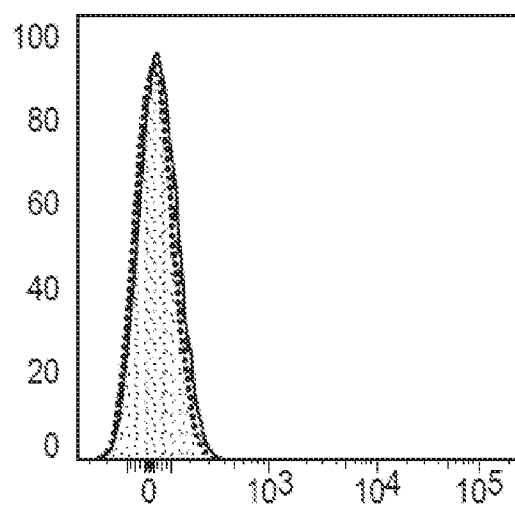
ФИГ. 8D



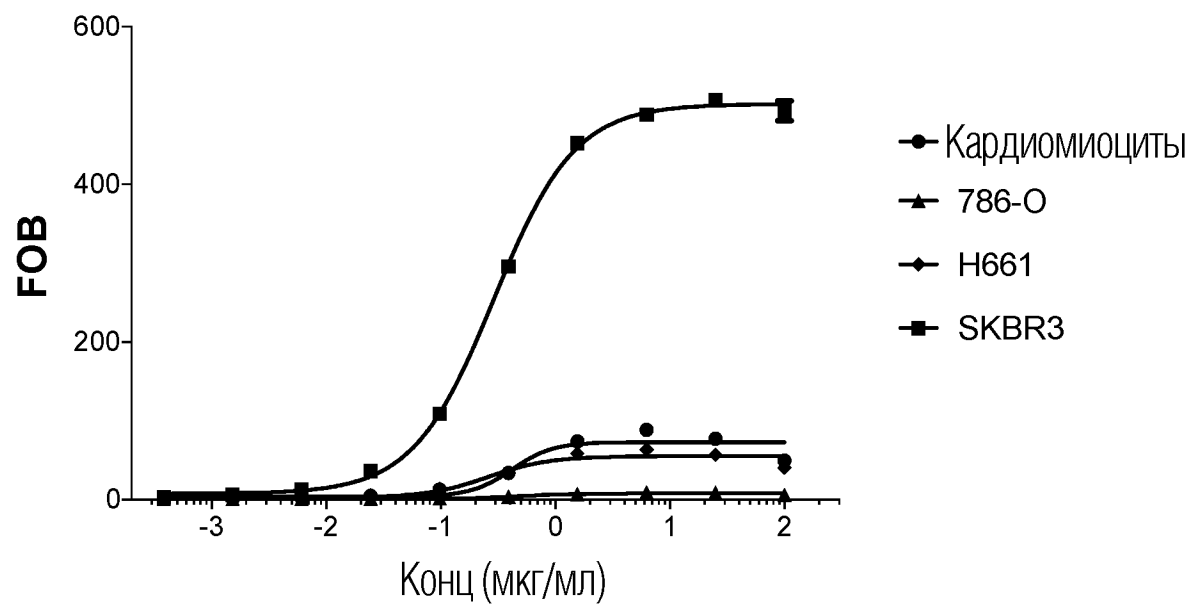
ФИГ. 8Е



ФИГ. 8F

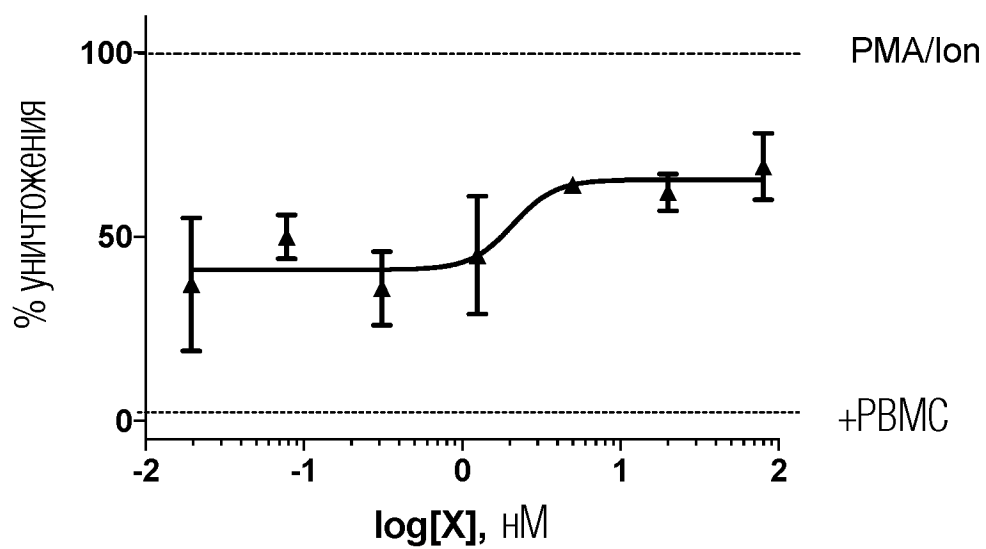


ФИГ. 9



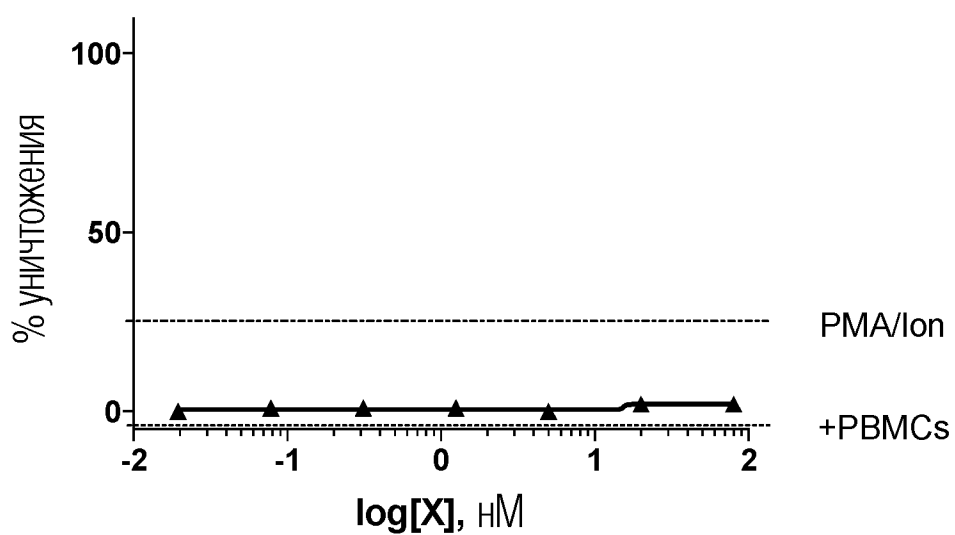
ФИГ. 10А

PBMC:SKBR3 = 1:1

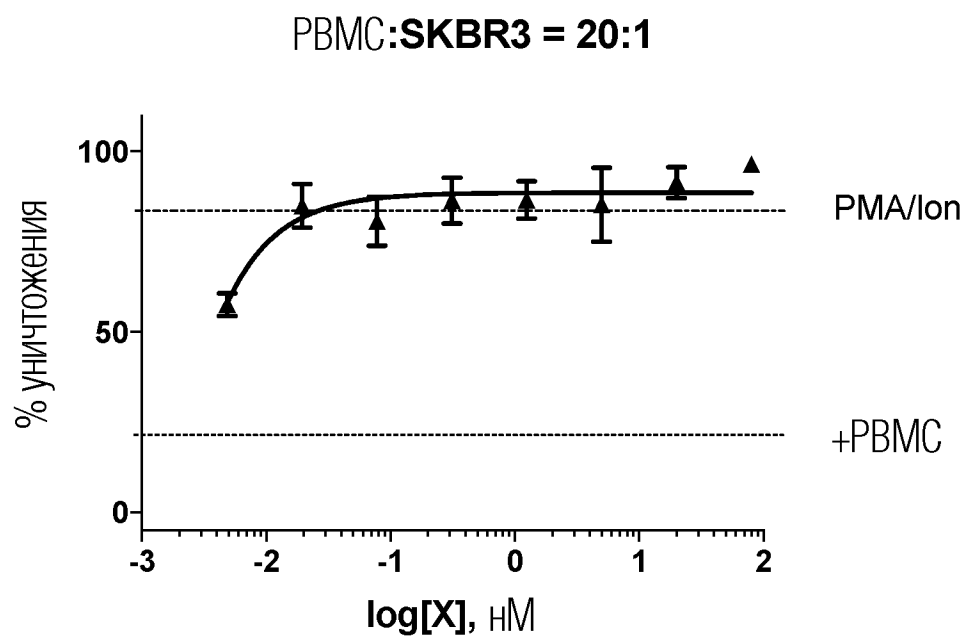


ФИГ. 10В

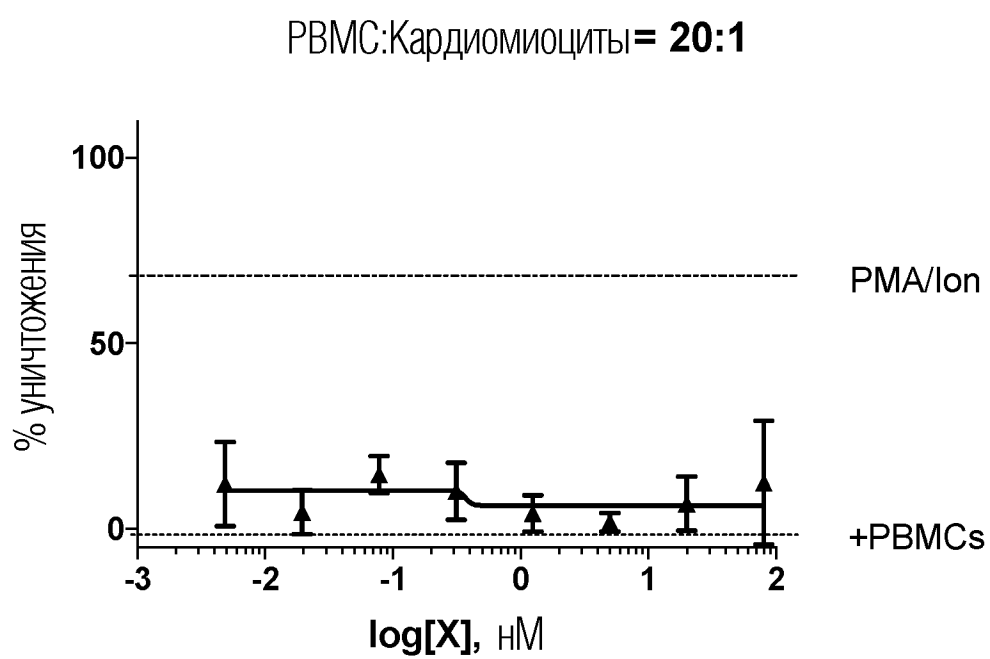
PBMC:Кардиомиоциты = 1:1



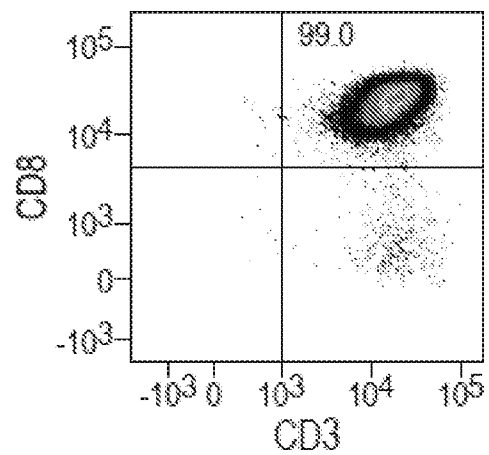
ФИГ. 11А



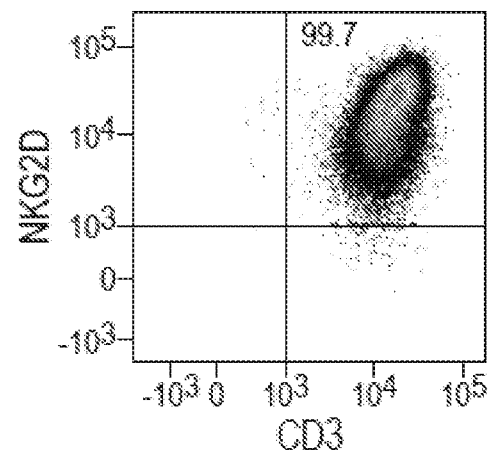
ФИГ. 11В



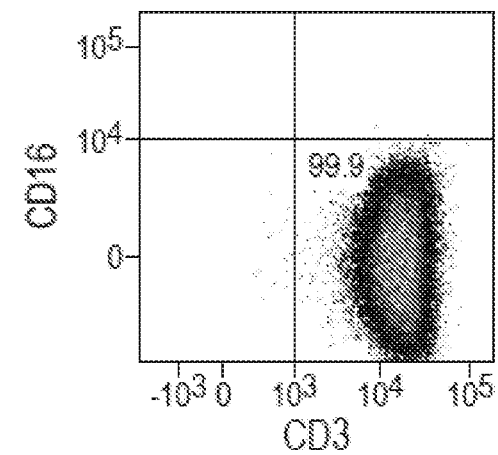
ФИГ. 12А



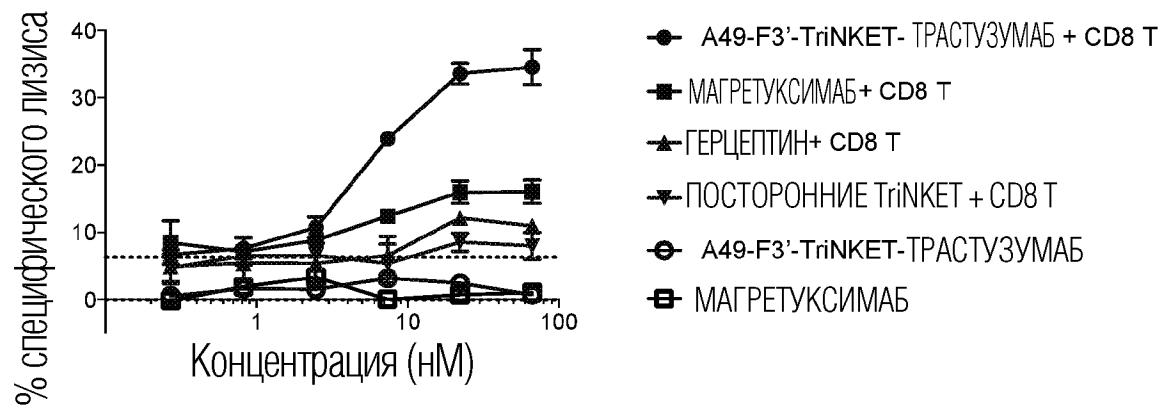
ФИГ. 12В



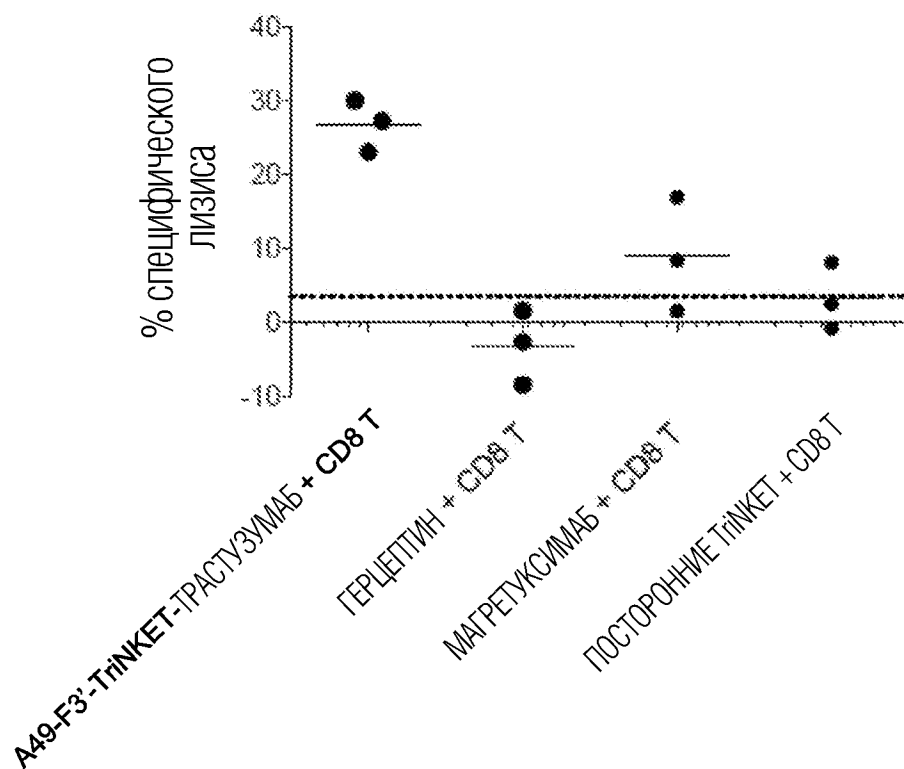
ФИГ. 12С



ФИГ. 13А

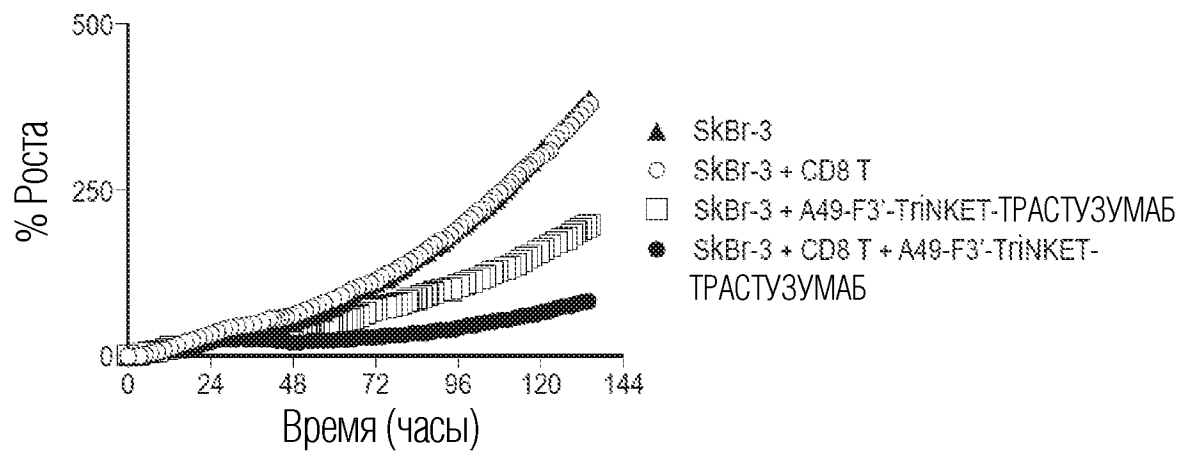


ФИГ. 13В



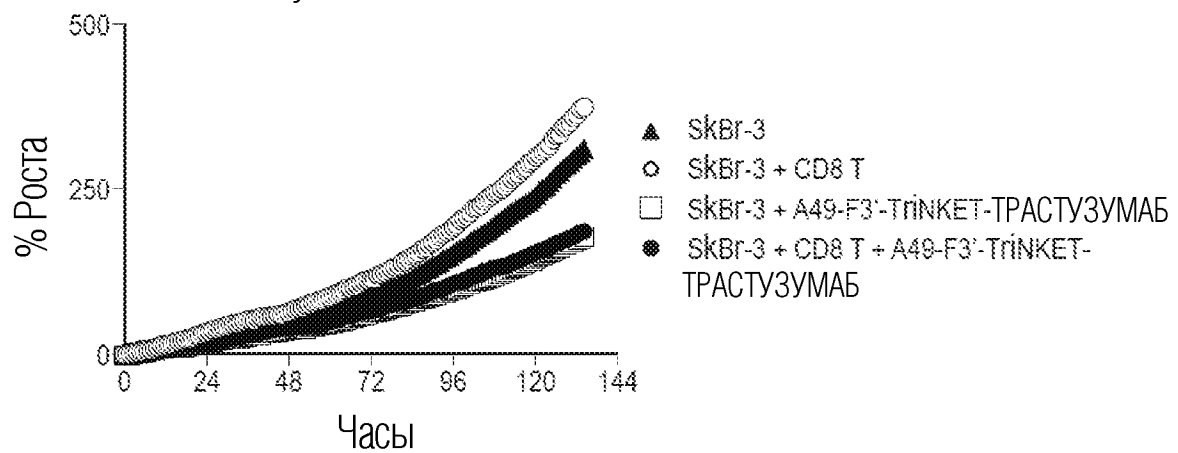
ФИГ. 14А

В присутствии анти-CD3

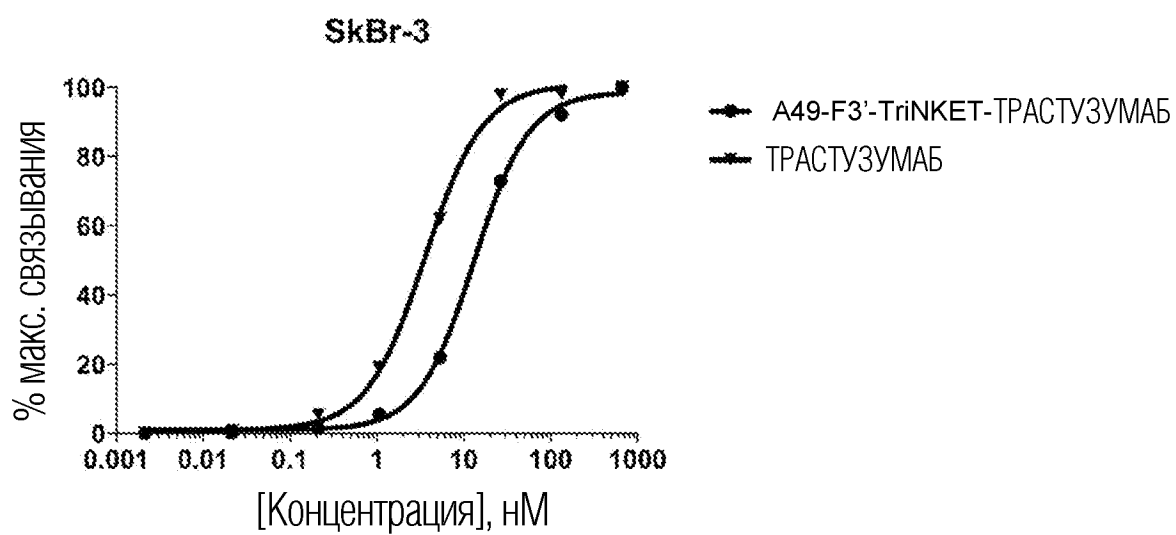


ФИГ. 14В

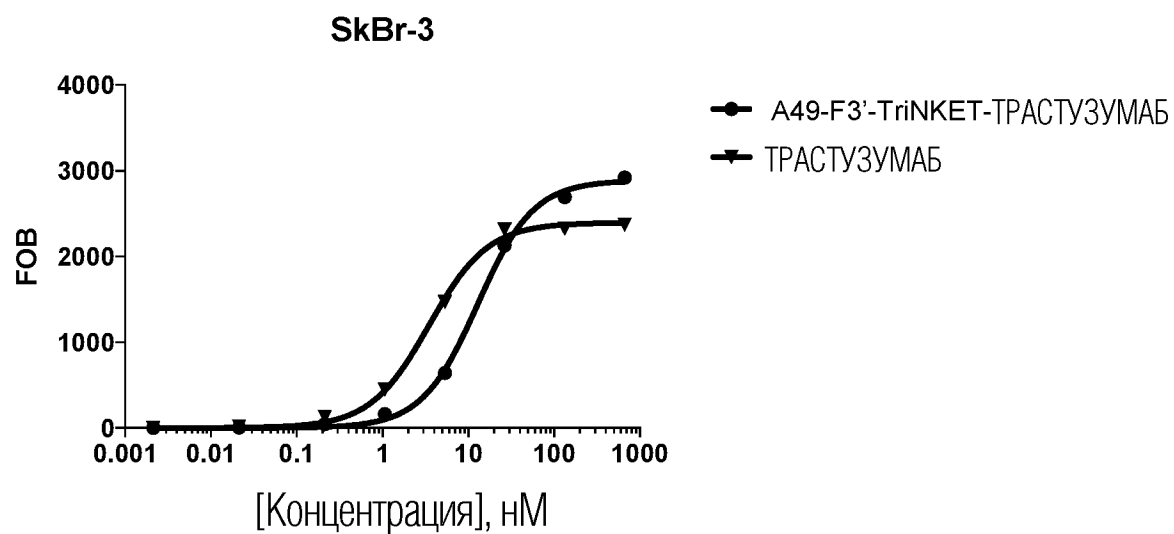
В отсутствие анти-CD3



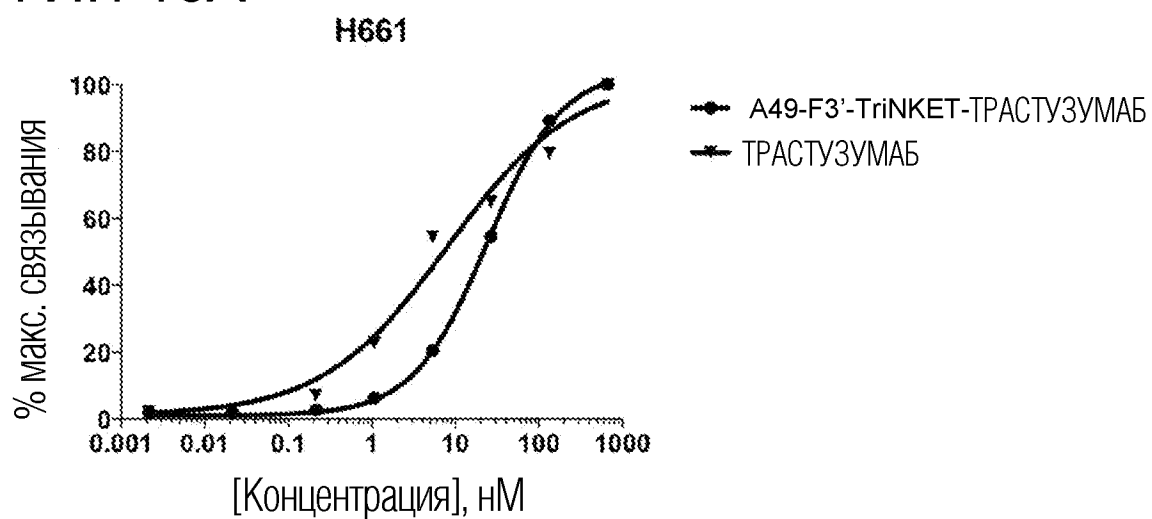
ФИГ. 15А



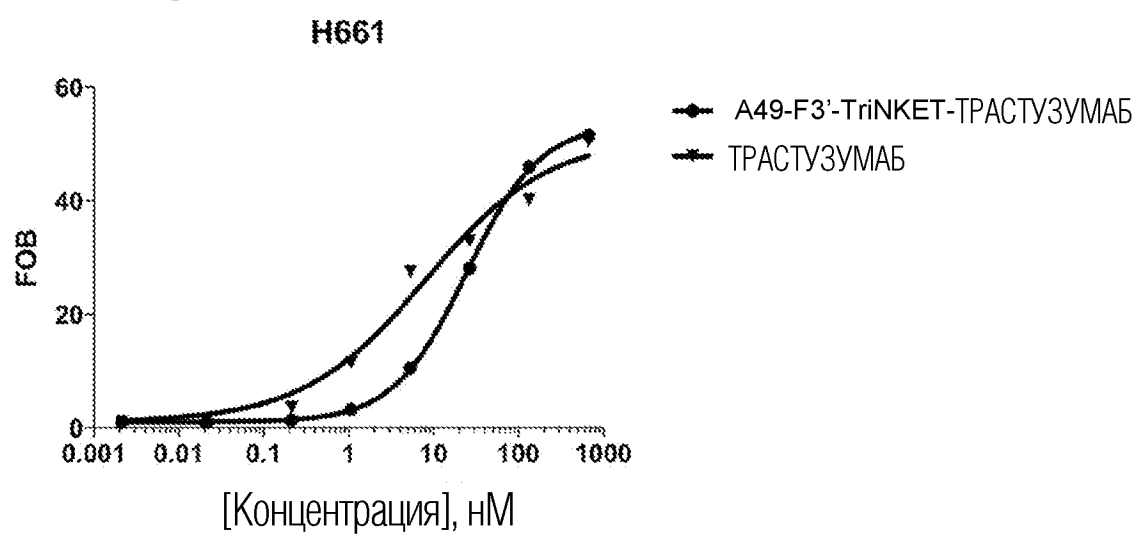
ФИГ. 15В



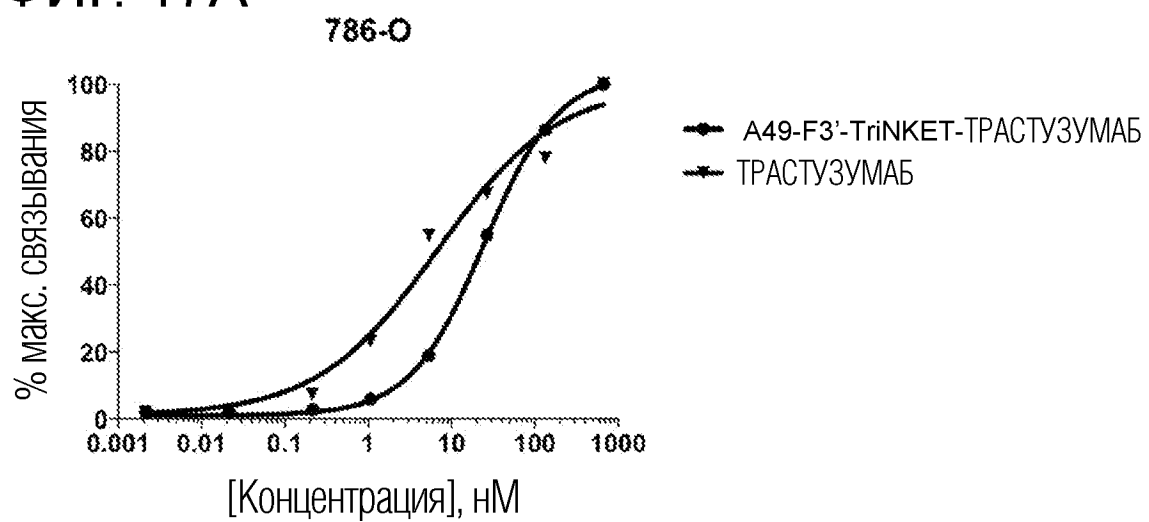
ФИГ. 16А



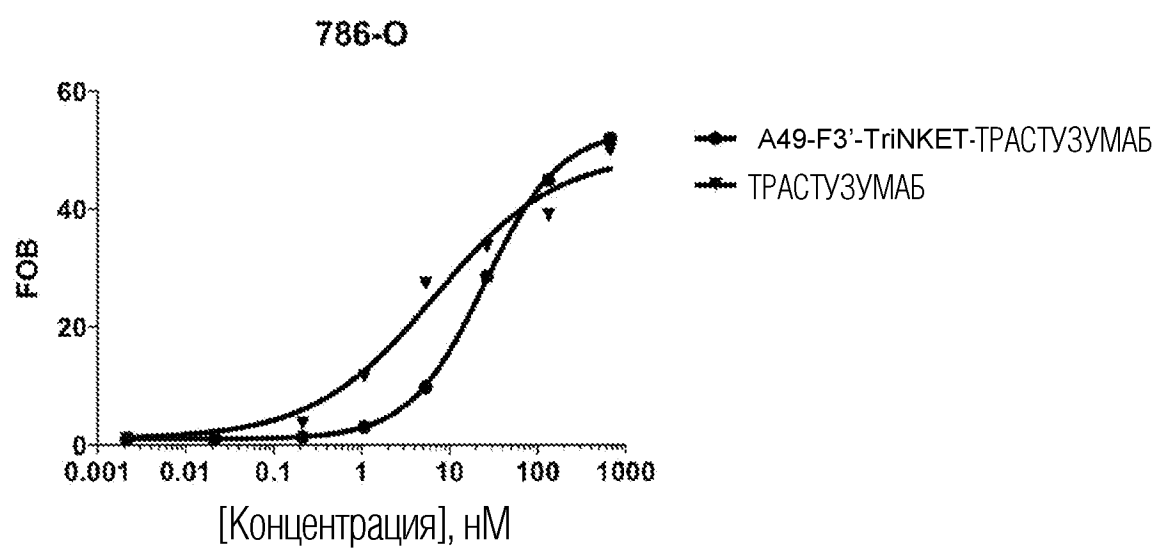
ФИГ. 16В



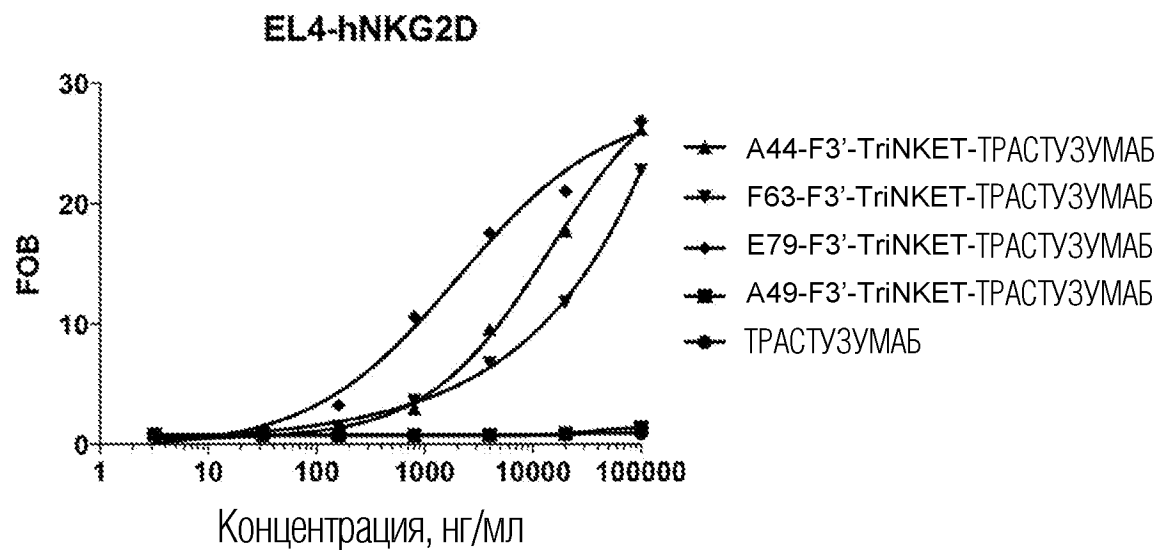
ФИГ. 17А



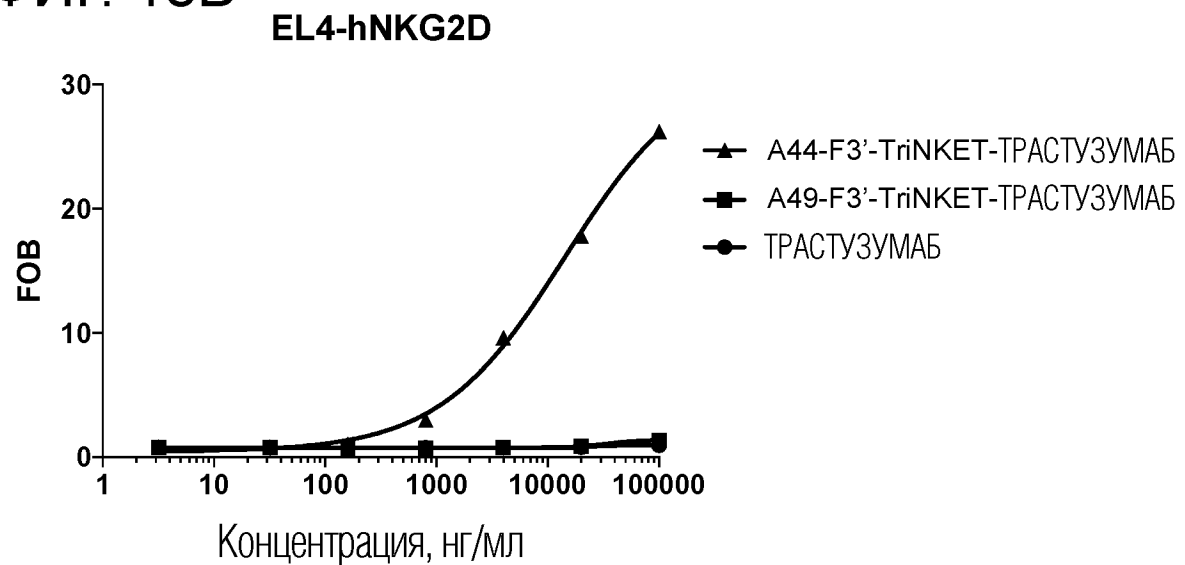
ФИГ. 17В



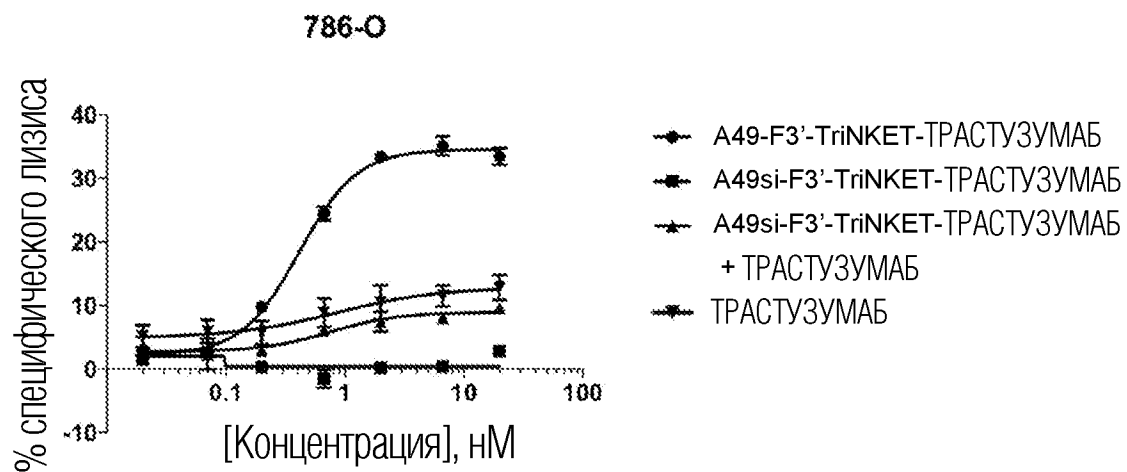
ФИГ. 18А



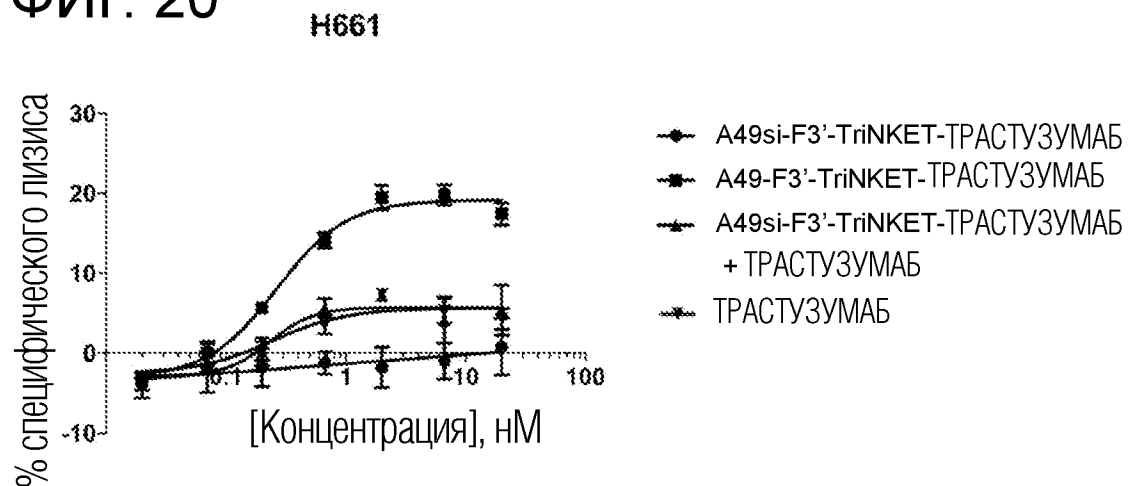
ФИГ. 18В



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21

