

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290918 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.04

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.16

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ NKG2D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/902,071; 62/902,080

(32) 2019.09.18

(33) US

(86) PCT/IB2020/058642

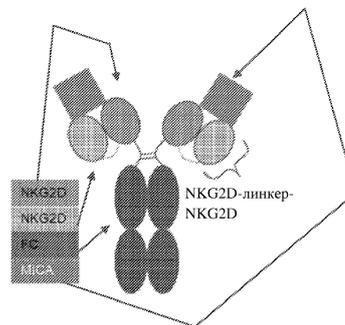
(87) WO 2021/053556 2021.03.25

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Эберсбах Хилмар, Эггер Филип,
Рамонду Эмили (CH), Салливан
Райан (US)

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

(57) Представлены слитые белки на основе NKG2D и варианты их применения для лечения различных заболеваний.



A1

202290918

202290918

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573298EA/026

СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ NKG2D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество согласно § 119(e) 35 U.S.C. В отношении следующих предварительных заявок на патенты США: (1) US 62/902071, поданной 18 сентября 2019 г., и (2) US 62/902080, поданной 18 сентября 2019 г. Описание данных предварительных заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Существует потребность в новых и эффективных терапевтических средствах для предупреждения и лечения широкого спектра типов рака. В настоящем документе предусмотрены решения этих и других проблем в данной области.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем документе предусмотрен димерный белок, который включает два мономера, где каждый мономер включает (1) первый пептид NKG2D или его вариант; (2) второй пептид NKG2D или его вариант; (3) первый пептидный линкер, соединяющий указанный первый пептид NKG2D или его вариант и указанный второй пептид NKG2D или его вариант; и (4) область, представляющую собой кристаллизующийся фрагмент (Fc-область) иммуноглобулина (Ig).

[0004] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант и второй пептид NKG2D или его вариант характеризуются идентичной аминокислотной последовательностью.

[0005] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант и второй пептид NKG2D или его вариант имеют разные аминокислотные последовательности.

[0006] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0007] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0008] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0009] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0010] В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый пептидный линкер.

[0011] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представлен формулой $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 9), где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

[0012] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой GGGSGGGS (SEQ ID NO: 10).

[0013] В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область иммуноглобулина G (IgG) человека.

[0014] В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG1 человека.

[0015] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.

[0016] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.

[0017] В некоторых вариантах осуществления мономер включает, в направлении от N-конца к C-концу, первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер, второй пептид NKG2D или его вариант и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант сливаются непосредственно с Fc-областью без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант связывают с Fc-областью посредством второго пептидного линкера.

[0018] В некоторых вариантах осуществления мономер включает, в направлении от N-конца к C-концу, Fc-область, первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер и второй пептид NKG2D или вариантную область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область слита непосредственно с первым пептидом NKG2D или его вариантом без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с первым пептидом NKG2D или его вариантом посредством второго пептидного линкера.

[0019] В некоторых вариантах осуществления мономер дополнительно содержит один или два дополнительных пептида NKG2D или их варианты.

[0020] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичности с любой последовательностью из SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, и 69.

[0021] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с

любым из SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, и 69.

[0022] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичности с любой последовательностью из SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, и 70.

[0023] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из любой последовательности из SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, и 70.

[0024] В некоторых вариантах осуществления два мономера ковалентно связаны.

[0025] В некоторых вариантах осуществления мономеры связаны посредством мостика Cys-Cys.

[0026] В некоторых вариантах осуществления димерный белок дополнительно содержит фрагмент, представляющий собой лекарственное средство.

[0027] Также в настоящем документе предусмотрен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из любой последовательности из SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, и 70.

[0028] Кроме того, в настоящем документе предусмотрен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе.

[0029] Кроме того, в настоящем документе предусмотрена композиция, содержащая димерный белок, описанный в настоящем документе, выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, или вектор, описанный в настоящем документе.

[0030] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0031] Также в настоящем документе предусмотрена клетка, содержащая димерный белок, описанный в настоящем документе, выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, вектор, описанный в настоящем документе, или композицию, описанную в настоящем документе.

[0032] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).

[0033] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой модифицированную клетку СНО.

[0034] В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка СНО содержит инактивированный ген матриптазы или характеризуется нокаутом (делецией) гена матриптазы.

[0035] В настоящем документе предусмотрен димерный белок, продуцируемый

клеткой, описанной в настоящем документе.

[0036] В настоящем документе предусмотрен способ лечения заболевания, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту димерного белка, описанного в настоящем документе, или композиции, описанной в настоящем документе.

[0037] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0038] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, заболевание печени, повреждение нерва, наследственную двигательную и сенсорную невропатию, старение или вирусную инфекцию.

[0039] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

[0040] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0041] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0042] В некоторых вариантах осуществления рак, при котором экспрессируется лиганд, представляет собой рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак почки, карциному носоглотки (NPC), рак предстательной железы, меланому, рак плазматических клеток, лейкоз, лимфому, глиому или нейробластому.

[0043] В некоторых вариантах осуществления лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

[0044] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает лечение субъекта с помощью дополнительной противораковой терапии или противоракового средства.

[0045] В некоторых вариантах осуществления дополнительная противораковая терапия представляет собой хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, генную терапию, ДНК-терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, адъювантную терапию или иммунотерапию.

[0046] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия против рака представляет собой химиотерапию, которая повреждает ДНК.

[0047] В некоторых вариантах осуществления лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

[0048] В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, колит, целиакию, рассеянный склероз, очаговую алопецию, диабет 1 типа, хроническую обструктивную болезнь легких, атеросклероз или метаболический синдром, связанный с диабетом 2 типа.

[0049] В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз печени, гипертензию воротной вены, неалкогольный стеатогепатит (NASH),

жировую болезнь печени и цирроз.

[0050] В некоторых вариантах осуществления повреждение нерва представляет собой травматические или токсические повреждения периферических или черепно-мозговых нервов, спинного мозга или головного мозга, черепно-мозговых нервов, черепно-мозговую травму, инсульт, церебральную аневризму, повреждение спинного мозга или повреждение, связанное с первопричинным генетическим заболеванием.

[0051] В некоторых вариантах осуществления наследственная моторная и сенсорная невропатия представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута (например, типа 1А, типа 2, типа 3 с пирамидными признаками или типа б) или болезнь Рефсума.

[0052] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция представляет собой гепатит, вызванную вирусом Эпштейна-Барр или цитомегаловирусом.

[0053] Также в настоящем документе предусмотрен способ диагностики заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, причем способ включает (1) получение биологического образца от субъекта, имеющего заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D; (2) приведение биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим описанный в настоящем документе димерный белок или описанную в настоящем документе композицию; и (3) обнаружение связывания лиганда NKG2D со связывающим реагентом; где связывание лиганда NKG2D со связывающим реагентом указывает на диагноз заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, у субъекта.

[0054] В некоторых вариантах осуществления лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

[0055] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения в качестве лекарственного препарата.

[0056] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания.

[0057] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0058] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0059] На **фиг. 1А-1В** представлены схематические изображения структуры NKG2D-Fc. На **фиг. 1А** представлен чертеж NKG2D (зеленым) - Fc (синим). На **фиг. 1В** представлена модель взаимодействия NKG2D-Fc с MICA (оранжевым) на основе PDB 1HYR.

[0060] На **фиг. 2А-2В** продемонстрировано превосходство N'-NKG2D (т. е. пептид(-ы) NKG2D расположен(-ы) на N-конце Fc-фрагмента) и двух гомодимеров NKG2D в индукции передачи сигнала ADCC в отношении клеток-мишеней NKG2D-L на основе анализа с применением репортерного гена. На **фиг. 2А** флуоресценцию с применением репортерного гена JNL индуцировали конструкциями NKG2D-Fc, что указывает на перекрестное связывание Fc-рецептора на клетках JNL при совместном культивировании с NKG2D-L+ клетками-мишенями. На **фиг. 2В** представлены чертежи вариантов NKG2D-Fc, использованных в данном эксперименте, содержащих либо N'-NKG2D (Н1/Н2), либо С' NKG2D (Н3/Н4) (т. е. пептид(-ы) NKG2D расположен(-ы) на С-конце Fc-фрагмента) и либо один гомодимер NKG2D (Н1/Н3), либо два гомодимера NKG2D (Н2/Н4).

[0061] На **фиг. 3А-3В** продемонстрировано, что суррогатные конструкции NKG2D-Fc мыши связываются с клетками, экспрессирующими лиганды NKG2D мыши, с оптимальной длиной линкера, равной 0 аминокислот. По оси Y отложена средняя флуоресценция R-PE. На **фиг. 3А** изображено связывание конструкций с клетками, сверхэкспрессирующими RAE-1-альфа мыши. На **фиг. 3В** изображено связывание конструкций с клетками, экспрессирующими RAE-1-эпсилон мыши.

[0062] На **фиг. 4А-4D** продемонстрировано, что два гомодимера NKG2D представляют собой оптимальную валентность, дополнительная валентность сверх двух гомодимеров не предоставляет значительного преимущества в отношении активности уничтожения на основе оптимизации валентности и ориентации NKG2D. На **фиг. 4А** изображены чертежи конструкций, использованных на **фиг. 4В**. На **фиг. 4В** изображены результаты анализа с применением репортерного гена ADCC в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих MICA*008 человека. На **фиг. 4С** изображены чертежи конструкций, использованных на **фиг. 4D**. На **фиг. 4D** изображены результаты анализа с применением репортерного гена, обуславливающего ADCC, в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих MICA*008 человека.

[0063] На **фиг. 5А-5D** представлена информация об иллюстративных вариантах NKG2D-Fc. На **фиг. 5А** представлены чертежи НН8 и НН2, двух вариантов NKG2D-Fc. НН8 отличается от НН2 делецией двух последовательностей FLNSLF. На **фиг. 5В** представлен чертеж структуры NKG2D-Fc. На **фиг. 5С** представлена полная последовательность НН2/НН8. Последовательности, выделенные красным, удалены из НН8. На **фиг. 5D** представлены характеристики продуцирования НН2, НН7 и НН8, изображены сенсограммы Viacore связывания НН2, НН7 и НН8 (график справа) и сводные данные по количественному определению (таблица слева).

[0064] На **фиг. 6** представлена последовательность HH8. NKG2D показан черным цветом, шарнирная область показана зеленым, CH2 показан синим, CH3 показан фиолетовым, сайты N-гликозилирования показаны красным, сайты изомеризации показаны оранжевым, а линкерная последовательность показана светло-зеленым (SEQ ID NO: 29).

[0065] На **фиг. 7** представлена последовательность HH10. NKG2D показан черным цветом, шарнирная область показана зеленым, CH2 показан синим, CH3 показан фиолетовым, сайты N-гликозилирования показаны красным, сайты изомеризации показаны оранжевым, а линкерная последовательность показана светло-зеленым (SEQ ID NO: 31).

[0066] На **фиг. 8** представлена последовательность HH8-afuco. NKG2D показан черным цветом, шарнирная область показана зеленым, CH2 показан синим, CH3 показан фиолетовым, сайты N-гликозилирования показаны красным, сайты изомеризации показаны оранжевым, а линкерная последовательность показана светло-зеленым (SEQ ID NO: 29).

[0067] На **фиг. 9A-9E** продемонстрировано, что продуцирование CHO улучшает ADCC-активность NKG2D-Fc. ADCC-Активность NKG2D-Fc измеряли по активности репортерного гена при совместном культивировании с CT26.WT-huMICA*008 (**фиг. 9A**), CT26.WT-huMICA*001 (**фиг. 9B**), CT26.WT-huMIB*001 (**фиг. 9C**) и CT26.WT-syMIB*05 (**фиг. 9D**). На **фиг. 9E** изображены сводные данные улучшения EC50 для NKG2D-Fc, происходящего из CHO, по сравнению с NKG2D-Fc, происходящим из HEK.

[0068] На **фиг. 10** изображена идентификация с помощью LC-MS сайта клиппирования во втором фрагменте NKG2D белка HH2, продуцируемого в клеточной линии CHO МаКО.

[0069] На **фиг. 11A-11B** продемонстрировано, что NKG2D-Fc специфически связывается со всеми восемью NKG2D-L с одноразрядным наномолярным значением EC50. На **фиг. 11A** представлен экспериментальный чертеж. На **фиг. 11B** изображено связывание HH8 с клетками, сверхэкспрессирующими NKG2D-L человека.

[0070] На **фиг. 12A-12B** продемонстрировано связывание HH8 со всеми исследованными NKG2D-L макака-крабода. На **фиг. 12A** представлен экспериментальный чертеж. На **фиг. 12B** изображено связывание HH8 с клетками, сверхэкспрессирующими NKG2D-L макака-крабода.

[0071] На **фиг. 13A-13B** продемонстрировано, что NKG2D-Fc связывается с линиями раковых клеток при многих различных показаниях, но не с нормальными huPBMC. На **фиг. 13A** изображено связывание NKG2D-Fc с линиями опухолевых клеток человека. На **фиг. 13B** изображено связывание NKG2D-Fc с нормальными PBMC человека.

[0072] На **фиг. 14A-14B** продемонстрировано, что NKG2D-Fc сохраняет экспрессию NKG2D *in vitro*. На **фиг. 14A** представлен экспериментальный чертеж. На **фиг. 14B** продемонстрировано, что экспрессия NKG2D на NK-клетках, совместно

культивируемых с NKG2D-L+ клетками-мишенями, восстанавливается путем добавления NKG2D-Fc.

[0073] На **фиг. 15** продемонстрировано, что варианты с улучшенной ADCC характеризуются лучшей функцией *in vitro*, показывая влияние различных вариантов аминокислот на ADCC-активность в анализе с применением репортерного гена.

[0074] На **фиг. 16A-16D** продемонстрировано, что НН8, НН10 и НН8-AFUCO способствуют ADCC в отношении NKG2D-L+ клеточных линий-мишеней. НН10 и НН8-AFUCO характеризуются улучшенной активностью в анализе на уничтожение NK3.3. На **фиг. 16A-16D** изображено специфическое уничтожение NKG2D-L+ клеточных линий-мишеней.

[0075] На **фиг. 17A-17E** продемонстрировано, что NKG2D-Fc непосредственно связывается с опухолевыми клетками и рекрутирует иммунные клетки для уничтожения опухолей посредством ADCC/ADCP, иницируя цикл противоракового иммунитета. На **фиг. 17A** продемонстрировано, что NKG2D-Fc, НН8, способствует уничтожению клеток НСТ-116 первичными НК-клетками человека. На **фиг. 17B-17C** продемонстрировано, что NKG2D-Fc, способствует уничтожению клеток OVCAR-3 первичными НК-клетками человека. На **фиг. 17D-17E** продемонстрировано, что NKG2D-Fc, НН8, способствует пролонгированной активации первичных НК-клеток человека при 96-часовом совместном культивировании с клетками НСТ-116, что измеряется экспрессией CD69, экспрессией NKG2D, размером и гранулярностью.

[0076] На **фиг. 18** продемонстрировано, что NKG2D-Fc, НН8, способствует уничтожению NKG2D-L+ опухолей посредством ADCP с субнанолярным значением EC50 в совместной культуре с первичными макрофагами мыши и опухолевыми клетками мыши, экспрессирующими NKG2D-L.

[0077] На **фиг. 19A-19F** продемонстрировано, что НН8 и НН10 способствуют развитию ADCC *in vitro* в отношении всех проанализированных NKG2D-L, включая huMICA*008 (**фиг. 19A**), huMICB*001 (**фиг. 19B**), huULBP1 (**фиг. 19C**), huULBP2 (**фиг. 19D**), суMICA*08 (**фиг. 19E**) и (**фиг. 19F**) суMICB*05 (**фиг. 19F**).

[0078] На **фиг. 20A-20B** изображена фармакокинетика NKG2D-Fc у мыши, демонстрируя влияние линии клеток-продуцентов и формата Fc на профиль *in vivo*. На **фиг. 20A** изображена фармакокинетика *in vivo* вариантов NKG2D-Fc, продуцируемых в НЕК или СНО или с вариантами Fc. На **фиг. 20B** изображена фармакокинетика *in vivo* вариантов NKG2D-Fc, продуцируемых в СНО.

[0079] На **фиг. 21A-21B** изображена фармакокинетика НН8 у макаков-крабоедов, демонстрируя РК профиль, подобный антителам, и сохранение способности связывать мишень после циркуляции *in vivo*. На **фиг. 21A** изображена концентрация НН8 через указанное количество часов после введения дозы, определенная количественно либо как общая концентрация, либо как количество, способное связываться с MICA *ex vivo* (мишень). На **фиг. 21B** изображена концентрация НН8 в сыворотке через указанное количество часов после введения дозы наряду с типичной симуляцией IgG.

[0080] На **фиг. 22А-22В** продемонстрировано, что мышинные опухоли со сверхэкспрессией NKG2D-L характеризуются слабой инфильтрацией CD8/NK, фенокопируя NKG2D-L+ опухоли человека. NKG2D-Fc восстанавливает присутствие мышинных CD8+ и NK-клеток в опухоли. На **фиг. 22А** представлен чертеж плана исследования. На **фиг. 22В** изображена количественная оценка инфильтрата NK-клеток и CD8+ Т-клеток в опухоли.

[0081] На **фиг. 23А-23В** продемонстрировано, что инфильтрирующие опухоль мышинные CD8+ и NK-клетки из NKG2D-L+ опухолей являются десенсибилизированными. NKG2D-Fc восстанавливает активацию инфильтрирующих опухоль NK и CD8+ Т-клеток. На **фиг. 23А** представлен чертеж исследования на мышах, показывающий лечение мышей либо изотипом, либо NKG2D-Fc в дозе 20 мг/кг в день 2 после имплантации опухоли. На **фиг. 23В** изображены фармакодинамические эффекты NKG2D-Fc через 5 дней после введения дозы, демонстрирующие восстановление экспрессии и активации NKG2D, измеренные с помощью CD69.

[0082] На **фиг. 24А-24В** продемонстрировано, что НН8 и НН10 эффективны в мышинных моделях. На **фиг. 24А** изображен рост опухоли EL4-huMICA*001 у мышей C57Bl/6, которым вводили изотип человеческого IgG1, НН8 или НН10 в дозе 5 мг/кг в дни 2 и 9. На **фиг. 24В** изображена кривая Каплана-Мейера для мышей из фигуры А.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0083] Определения

[0084] Хотя в настоящем документе показаны и описаны различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления и аспекты приведены только в качестве примера. Теперь специалистам в данной области будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены, не выходящие за рамки объема настоящего изобретения. Следует понимать, что при осуществлении настоящего изобретения на практике могут быть использованы различные альтернативы описанным в настоящем документе вариантам осуществления настоящего изобретения.

[0085] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Следующие ссылки предоставляют специалисту общее определение многих терминов, используемых в настоящем изобретении: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Следующие термины, используемые в настоящем документе, имеют приписанные им значения, если не указано иное.

[0086] Использование формы единственного числа в настоящем изобретении и в следующих пунктах формулы изобретения следует традиционному подходу в патентах со значением "по меньшей мере один", за исключением ситуации, когда в конкретном случае

из контекста ясно, что этот термин в данном конкретном случае означает конкретно один и только один. Аналогичным образом, термин "содержащий" является открытым, не исключая дополнительных элементов, признаков, компонентов и т. д. Ссылки, указанные в настоящем документе, прямо включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, если не указано иное.

[0087] Термины "содержать", "включать" и "иметь", а также их производные используются в настоящем документе взаимозаменяемо как всеобъемлющие, открытые термины. Например, использование терминов "содержащий", "включающий" или "имеющий" означает, что любой элемент, содержащийся, имеющийся или включенный, не является единственным элементом, охватываемым подлежащим в предложении, содержащем глагол.

[0088] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично аминокислотам, встречающимся в природе. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также такие аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например гидроксипролин, γ -карбоксихлутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые характеризуются такой же основной химической структурой, что и встречающаяся в природе аминокислота, т. е. имеют α -углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте. Термины "не встречающаяся в природе аминокислота" и "неприродная аминокислота" относятся к аналогам аминокислот, синтетическим аминокислотам и миметикам аминокислот, которые не встречаются в природе.

[0089] Аминокислоты могут обозначаться в настоящем документе с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов или с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Подобным образом, нуклеотиды могут обозначаться с помощью их общепринятых однобуквенных кодов.

[0090] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков, где полимер в вариантах осуществления может быть конъюгирован с фрагментом, который не состоит из аминокислот. Данные термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой

искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимерам из не встречающихся в природе аминокислот. "Слитый белок" относится к химерному белку, кодирующему две или более отдельных белковых последовательностей, которые рекомбинантно экспрессируются в виде одного фрагмента.

[0091] Используемые в настоящем документе термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "олигомер нуклеиновой кислоты", "олигонуклеотид", "последовательность нуклеиновой кислоты", "фрагмент нуклеиновой кислоты" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо и предназначены для включения без ограничения полимерной формы нуклеотидов, ковалентно связанных друг с другом, которые могут иметь различную длину, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов, производных или модификаций. Разные полинуклеотиды могут иметь разную трехмерную структуру и могут выполнять различные функции, известные или неизвестные. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, экзон, интрон, межгенную ДНК (включая без ограничения гетерохроматическую ДНК), матричную РНК (mRNA), транспортную РНК, рибосомную РНК, рибозим, cDNA, рекомбинантный полинуклеотид, разветвленный полинуклеотид, плазмиду, вектор, выделенную ДНК последовательности, выделенную РНК последовательности, зонд на основе нуклеиновой кислоты и праймер. Полинуклеотиды, применимые в способах по настоящему изобретению, могут содержать последовательности природной нуклеиновой кислоты и их варианты, последовательности искусственной нуклеиновой кислоты или комбинацию таких последовательностей.

[0092] Полинуклеотид обычно состоит из определенной последовательности четырех нуклеотидных оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G) и тимина (T) (урацила (U) вместо тимина (T), когда полинуклеотид представляет собой РНК). Таким образом, термин "полинуклеотидная последовательность" представляет собой буквенное представление молекулы полинуклеотида; альтернативным образом, этот термин может быть применен к самой молекуле полинуклеотида. Это буквенное представление можно вводить в базы данных на компьютере, имеющем центральный процессор, и использовать для приложений биоинформатики, таких как функциональная геномика и поиск гомологии. Полинуклеотиды могут необязательно включать один или несколько нестандартных нуклеотидов, аналогов нуклеотидов и/или модифицированных нуклеотидов.

[0093] "Варианты с консервативными модификациями" относятся как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, "консервативно модифицированные варианты" относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по сути идентичные аминокислотные последовательности. Вследствие вырожденности генетического кода любой указанный белок будет кодироваться рядом последовательностей нуклеиновой кислоты. Например,

все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном задан аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты представляют собой "молчащие варианты", являющиеся одной из разновидностей вариантов с консервативными модификациями. В настоящем документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, неявно определен в каждой описанной последовательности.

[0094] Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, при которых происходит изменение, добавление или удаление одной аминокислоты или небольшой процентной доли аминокислот в кодируемой последовательности, относятся к "варианту с консервативной модификацией", если изменение приводит к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в уровне техники. Такие варианты с консервативной модификацией дополняют, а не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по настоящему изобретению.

[0095] Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (C), метионин (M).

(см., например, Creighton, Proteins (1984)).

[0096] "Процентное значение идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом для оптимального выравнивания этих двух последовательностей часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций). Процентное

значение рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречаются идентичные основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей.

[0097] Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е. приблизительно 60% идентичности, предпочтительно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или больший процент идентичности в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области), при измерении с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, веб-сайт NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> или т. п.). Такие последовательности в таком случае называются "по сути идентичными". Это определение также относится или может быть применено к дополнению исследуемой последовательности. Определение также включает последовательности с делециями и/или добавлениями, а также последовательности с заменами. Как описано ниже, предпочтительные алгоритмы могут учитывать гэпы и т. п. Предпочтительно, идентичность существует в области, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 25 аминокислот или нуклеотидов, или, более предпочтительно, в области, длина которой составляет 50-100 аминокислот или нуклеотидов.

[0098] "Положение" аминокислоты или нуклеотидного основания обозначается числом, которое последовательно идентифицирует каждую аминокислоту (или нуклеотидное основание) в эталонной последовательности на основе ее положения относительно N-конца (или 5'-конца). Из-за делеций, вставок, усечений, слияний и т. п., которые необходимо учитывать при определении оптимального выравнивания, обычно количество аминокислотных остатков в исследуемой последовательности, определяемое простым подсчетом от N-конца, не обязательно будет совпадает с номером соответствующего положения в эталонной последовательности. Например, в случае, когда вариант характеризуется делецией относительно выровненной эталонной последовательности, в варианте не будет аминокислоты, которая соответствует положению в эталонной последовательности в месте делеции. При наличии вставки в выровненной эталонной последовательности эта вставка не будет соответствовать пронумерованному положению аминокислоты в эталонной последовательности. В случае усечений или слияний могут иметь место отрезки аминокислот либо в эталонной, либо в

выровненной последовательности, которые не соответствуют ни одной аминокислоте в соответствующей последовательности.

[0099] Термины "пронумеровано со ссылкой на" или "соответствует" при использовании в контексте нумерации указанной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности относятся к нумерации остатков конкретной эталонной последовательности, когда указанная аминокислотная или полинуклеотидная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью.

[0100] Термин "зонд" или "праймер", используемый в настоящем документе, определяется как один или несколько фрагментов нуклеиновой кислоты, чья специфическая гибридизация с образцом может быть обнаружена. Зонд или праймер могут быть любой длины в зависимости от конкретной методики, для которой они будут использоваться. Например, праймеры для ПЦР обычно характеризуются длиной от 10 до 40 нуклеотидов, в то время как зонды на основе нуклеиновых кислот, например для Саузерн-блоттинга, могут характеризоваться длиной более ста нуклеотидов. Зонд может быть немеченым или меченым, как описано ниже, чтобы можно было обнаружить его связывание с мишенью или образцом. Зонд может быть получен из источника нуклеиновых кислот из одной или нескольких конкретных (предварительно выбранных) частей хромосомы, например одного или нескольких клонов, выделенной целой хромосомы, или фрагмента хромосомы, или набора продуктов амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР). Длина и сложность нуклеиновой кислоты, прикрепленной к элементу-мишени, не являются критическими для настоящего изобретения. Специалист в данной области может отрегулировать эти факторы, чтобы обеспечить оптимальную гибридизацию и продуцирование сигнала для данной процедуры гибридизации, а также обеспечить требуемое разрешение среди различных генов или геномных положений.

[0101] Зонд также может представлять собой выделенные нуклеиновые кислоты, иммобилизованные на твердой поверхности (например, нитроцеллюлозе, стекле, кварце, сплавленных срезах кварца), как в чипе. В некоторых вариантах осуществления зонд может быть элементом чипа нуклеиновых кислот, как описано, например, в WO 96/17958. Для этой цели также можно использовать методики, позволяющие создавать чипы высокой плотности (см., например, Fodor (1991) *Science* 767-773; Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8: R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23: 1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23: 120-124; патент США № 5143854).

[0102] Фраза "селективно (или специфически) гибридизуется с" относится к связыванию, образованию дуплексов или гибридизации молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью с большей аффинностью, например в более жестких условиях, чем с другими нуклеотидными последовательностями (например, с общей клеточной или библиотечной ДНК или РНК).

[0103] Фраза "жесткие условия гибридизации" относится к условиям, при которых нуклеиновая кислота будет гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью,

обычно в сложной смеси нуклеиновых кислот, но не с другими последовательностями. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными при разных обстоятельствах. Более длинные последовательности специфически гибридизуются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Как правило, жесткие условия гибридизации выбирают так, чтобы они были приблизительно на 5-10°C ниже тепловой точки плавления (T_m) конкретной последовательности при определенной ионной силе рН. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе, рН и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесном состоянии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50% зондов заняты в равновесном состоянии). Жесткие условия гибридизации также могут быть достигнуты при добавлении дестабилизирующих средств, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал по меньшей мере в два раза сильнее фона, предпочтительно в 10 раз сильнее фоновой гибридизации. Иллюстративные жесткие условия гибридизации могут быть следующими: 50% формамида, 5xSSC и 1% SDS, инкубация при 42°C, или 5xSSC, 1% SDS, инкубация при 65°C, с промывкой в 0,2xSSC и 0,1% SDS при 65°C. Примеры "умеренно жестких условий гибридизации" включают гибридизацию в буфере, содержащем 40% формамида, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 1xSSC при 45°C. Положительная гибридизация по меньшей мере в два раза превышает фоновую. Специалисты в данной области легко поймут, что можно использовать альтернативные условия гибридизации и промывки для обеспечения условий аналогичной жесткости. Дополнительные руководства по определению параметров гибридизации представлены в многочисленных источниках, например *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, et al., John Wiley & Sons.

[0104] Используемый в настоящем документе термин "конъюгат" относится к ассоциации между атомами или молекулами. Ассоциация может быть прямой или опосредованной. Например, конъюгат между первым фрагментом (например, фрагмент, представляющий собой нуклеиновую кислоту) и вторым фрагментом (фрагментом, представляющим собой пептид), предусмотренный в настоящем документе, может быть прямым, например посредством ковалентной связи, или опосредованным, например посредством нековалентной связи (например, электростатических взаимодействий (например, ионной связи, водородной связи, галогенной связи), ван-дер-ваальсовых взаимодействий (например, диполь-диполь, диполь-индуцированный диполь, лондоновских дисперсионных сил), стэкинг-взаимодействий колец (пи-эффектов), гидрофобных взаимодействий и т. п.). В некоторых вариантах осуществления конъюгаты образуются с использованием химии конъюгатов, включая без ограничения нуклеофильные замещения (например, реакции аминов и спиртов с ацилгалогенидами,

активными сложными эфирами), электрофильные замещения (например, реакции енамина) и присоединения к множественным связям типа углерод-углерод и углерод-гетероатом (например, реакция Михаэля, присоединение по Дильсу-Альдеру). Эти и другие полезные реакции обсуждаются, например, в March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; и Feeney et al., *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

[0105] Для конкретных белков, описанных в настоящем документе (например, NKG2D, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6), названный белок включает любые встречающиеся в природе формы белка или варианты, которые сохраняют ожидаемую активность белка (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным белком). В некоторых вариантах осуществления варианты характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающейся в природе формой. В других вариантах осуществления белок представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI. В других вариантах осуществления белок представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI, или его функциональный фрагмент.

[0106] Так, NKG2D также называется KLRK1; представитель 1 подсемейства К лектиноподобного рецептора клеток-киллеров; CD314; KLR; NKG2-D; FLJ17759; FLJ75772 или D12S2489E, трансмембранный белок, принадлежащий к семейству CD94/NKG2 лектиноподобных рецепторов С-типа. У человека он экспрессируется NK-клетками, $\gamma\delta$ -Т-клетками и CD8+ $\alpha\beta$ -Т-клетками. NKG2D распознает индуцированные собственные белки из семейств MIC и RAET1/ULBP, которые появляются на поверхности подвергшихся стрессу, злокачественно трансформированных и инфицированных клеток. NKG2D, описанный в настоящем документе, включает любую из встречающихся в природе форм NKG2D или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, по меньшей мере в пределах 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным NKG2D). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи NKG2D характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе NKG2D. В других вариантах осуществления NKG2D представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_031386. В других вариантах осуществления NKG2D по

сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_031386), или его функциональному фрагменту. Более подробные описания различных типов вариантов NKG2D, которые можно использовать в димерных белках, описанных в настоящем документе, представлены ниже.

[0107] Термин "MICA", также обозначаемый как связанная с полипептидом MHC класса I последовательность A, MIC-A, PERB11.1, включает любые встречающиеся в природе формы MICA или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативной MICA). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи MICA характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающейся в природе MICA. В других вариантах осуществления MICA представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_000238, NP_001170990, NP_001276081, NP_001276082 или NP_001276083. В других вариантах осуществления MICA по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_000238, NP_001170990, NP_001276081, NP_001276082 или NP_001276083), или его функциональному фрагменту.

[0108] Термин "MICB", также обозначаемый как связанная с полипептидом MHC класса I последовательность B, MIC-B, PERB11.2, включает любые встречающиеся в природе формы MICB или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативной MICB). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи MICB характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающейся в природе MICB. В других вариантах осуществления MICB представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI NP_001276089, NP_001276090 или NP_005922. В других вариантах осуществления MICB по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_001276089, NP_001276090 или NP_005922), или его функциональному фрагменту.

[0109] Термин "ULBP1", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 1,

RAET1I, N2DL-1, NKG2DL1, включает любую из встречающихся в природе форм ULBP1 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP1). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP1 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе ULBP1. В других вариантах осуществления ULBP1 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_001304018 или NP_079494. В других вариантах осуществления ULBP1 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_001304018 или NP_079494), или его функциональному фрагменту.

[0110] Термин "ULBP2", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 2, N2DL2, RAET1H, ALCAN-альфа, NKG2DL2, RAET1L, включает любую из встречающихся в природе форм ULBP2 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP2). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP2 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе ULBP2. В других вариантах осуществления ULBP2 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_079493. В других вариантах осуществления ULBP2 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_079493), или его функциональному фрагменту.

[0111] Термин "ULBP3", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 3, RAET1N, N2DL-3, NKG2DL3, включает любую из встречающихся в природе форм ULBP3 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP3). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP3 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со

встречающимся в природе ULBP3. В других вариантах осуществления ULBP3 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_078794. В других вариантах осуществления ULBP3 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_078794), или его функциональному фрагменту.

[0112] Термин "ULBP4", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 4, RAET1E, LETAL, N2DL-4, NKG2DL4, RAET1E2, RL-4, bA350J20.7, ранний транскрипт 1E ретиновой кислоты, включает любую из встречающихся в природе форм ULBP4 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP4). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP4 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе ULBP4. В других вариантах осуществления ULBP4 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_001230254, NP_001230256, NP_001230257 или NP_631904. В других вариантах осуществления ULBP4 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_001230254, NP_001230256, NP_001230257 или NP_631904), или его функциональному фрагменту.

[0113] Термин "ULBP5", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 5 или ранний транскрипт 1G ретиновой кислоты (RAET1G), включает любую из встречающихся в природе форм ULBP5 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP5). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP5 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе ULBP5. В других вариантах осуществления ULBP5 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_001001788.2. В других вариантах осуществления ULBP5 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_001001788.2), или его функциональному фрагменту.

[0114] Термин "ULBP6", также обозначаемый как UL16-связывающий белок 6 или

ранний транскрипт 1L ретиноевой кислоты (RAET1L), включает любую из встречающихся в природе форм ULBP6 или варианты, которые сохраняют свою белковую активность (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным ULBP6). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи ULBP6 характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающимся в природе ULBP6. В других вариантах осуществления ULBP6 представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI: NP_570970.2. В других вариантах осуществления ULBP6 по сути идентичен (например, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) белку, идентифицированному по его эталонной последовательности в NCBI (NP_570970.2), или его функциональному фрагменту.

[0115] Используемый в настоящем документе термин "линкер" или "линкер биоконъюгата" относится к молекуле, которая приводит к ассоциации между атомами или молекулами реакционноспособных групп биоконъюгата. Ассоциация может быть прямой или опосредованной. Например, конъюгат между первой реакционноспособной группой биоконъюгата (например, -NH₂, -COOH, -N-гидрохисукцинимид или -малеимид) и второй реакционноспособной группой биоконъюгата (например, сульфгидрил, серосодержащая аминокислота, амин, аминокислота, содержащая аминовую боковую цепь, или карбоксилат), предусмотренный в настоящем документе, может быть прямым, например посредством ковалентной связи, или опосредованным, например посредством нековалентной связи (например, электростатических взаимодействий (например, ионной связи, водородной связи, галогенной связи), ван-дер-ваальсовых взаимодействий (например, диполь-диполь, диполь-индуцированный диполь, лондоновских дисперсионных сил), стэкинг-взаимодействий колец (π-эффектов), гидрофобных взаимодействий и т. п.). В некоторых вариантах осуществления линкеры биоконъюгатов образуются с использованием химии биоконъюгатов (т. е. объединения двух реакционноспособных групп биоконъюгатов), включая без ограничения нуклеофильные замещения (например, реакции аминов и спиртов с ацилгалогенидами, активными сложными эфирами), электрофильные замещения (например, реакции енамина) и присоединения к множественным связям типа углерод-углерод и углерод-гетероатом (например, реакция Михаэля, присоединение по Дильсу-Альдеру). Эти и другие полезные реакции обсуждаются, например, в March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; и Feeney et al., *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982. В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата

(например, малеимидный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, сульфгидрилу). В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата (например, галоацетильный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, сульфгидрилу). В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата (например, пиридилный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, сульфгидрилу). В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата (например, -N-гидроксисукцинимидный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, амину). В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата (например, малеимидный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, сульфгидрилу). В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа биоконъюгата (например, -сульфо-N-гидроксисукцинимидный фрагмент) ковалентно присоединена ко второй реакционноспособной группе биоконъюгата (например, амину).

[0116] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления длина гибкого пептидного линкера составляет приблизительно 20 или менее аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит приблизительно 12 или менее аминокислотных остатков, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера находится в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет более 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит две или более из следующих аминокислот: глицин, серин, аланин и пролин. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер представлен формулой $(GS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер G4S, представленный формулой $(GGGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер G4A, представленный формулой $(GGGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 12). В некоторых

вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер G4P, представленный формулой (GGGGP)_n, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер G3A, представленный формулой (GGGA)_n, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представлен формулой (GGGS)_n, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер представлен формулой GGGSGGGS (SEQ ID NO: 10).

[0117] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает протеазозависимый сайт расщепления. Примеры расщепляемых протеазами пептидных линкеров включают без ограничения линкер, чувствительный в отношении MMP, GGPLGL W AGG (SEQ ID NO: 15), и линкер, чувствительный в отношении фактора Ха, IEGR (SEQ ID NO: 16). Специалисту в данной области должно быть понятно, что для линкера, предусмотренного в настоящем документе, можно использовать множество расщепляемых последовательностей.

[0118] В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула или линкер могут представлять собой непептидный линкер. Непептидный линкер в контексте данного документа представляет собой биосовместимый полимер, включающий две или более повторяющихся единиц, связанных друг с другом. Примеры непептидного полимера включают без ограничения полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG), сополимер (этилен/пропилен)гликоль, полиоксиэтилен (POE), полиуретан, полифосфазен, полисахариды, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидоны, поливинилэтиловый эфир, полиакриламид, полиакрилат, полицианоакрилаты, липидные полимеры, хитины, гиалуроновую кислоту и гепарин. Более подробное описание непептидных линкеров, применимых для слитых молекул на основе Fc, см., например, в WO/2006/107124, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такие линкеры будут характеризоваться молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 1 кДа до 50 кДа в зависимости от конкретного линкера. В некоторых вариантах осуществления типичный PEG характеризуется молекулярной массой от приблизительно 1 до 5 кДа, а полиэтиленгликоль характеризуется молекулярной массой от приблизительно 5 кДа до 50 кДа и более предпочтительно от приблизительно 10 кДа до 40 кДа.

[0119] Используемый в настоящем документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления "вектор" представляет собой любой генетический элемент (например, ДНК, РНК или их смесь), который предусматривает нуклеиновую кислоту, представляющую интерес, которая обладает способностью экспрессироваться в клетке-хозяине, например нуклеиновую кислоту, представляющую интерес, в пределах более крупной последовательности нуклеиновой кислоты или структуры, подходящей для доставки в клетку, ткань и/или организм, как, например, плаزمид, фаг, транспозон, космида, хромосома, вирус, вирион и

т. д. Например, вектор может содержать вставку (например, гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую ген, подлежащий экспрессированию, или открытую рамку считывания данного гена) и один или несколько дополнительных элементов, например элемент, подходящий для осуществления доставки или контроля экспрессии вставки. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к линейной или кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую посредством лигирования могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где путем лигирования дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы для млекопитающих) интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и благодаря этому реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе "векторами экспрессии". В целом, векторы экспрессии, применимые в методиках рекомбинантной ДНК, часто представлены в форме плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее широко используемой формой вектора. Тем не менее, предполагается, что настоящее изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии, как, например, вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции. Кроме того, некоторые вирусные векторы способны нацеливаться на определенный тип клеток либо специфически, либо неспецифически. Некомпетентные к репликации вирусные векторы или вирусные векторы с дефектной репликацией относятся к вирусным векторам, которые способны инфицировать свои клетки-мишени и доставлять их вирусную нагрузку, но затем не могут продолжить типичный литический путь, который приводит к лизису и гибели клеток.

[0120] В некоторых вариантах осуществления "вектор", описанный в настоящем документе, в частности, относится к полинуклеотиду, способному нести по меньшей мере один полинуклеотидный фрагмент. Вектор действует как молекулярный носитель, доставляя полинуклеотиды в клетку-хозяина. Вектор экспрессии может содержать по меньшей мере одну кассету экспрессии, содержащую регуляторные последовательности для надлежащей экспрессии включенного в нее полинуклеотида. Полинуклеотиды (например, кодирующие представляющий интерес полипептид или селективируемый маркер), которые подлежат введению в клетку, могут быть вставлены в кассету(-ы) экспрессии вектора для экспрессии из нее(них). При введении в клетку-хозяина кассета экспрессии, помимо прочего, способна управлять механизмом клетки для транскрибирования встроенного полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, в РНК, которая затем обычно подвергается дальнейшему процессингу и,

наконец, транслируется в представляющий интерес полипептид. Вектор может присутствовать в кольцевой или линейной (линеаризованной) форме. Термин "вектор" также включает искусственные хромосомы, вирусные векторы или аналогичные соответствующие полинуклеотиды, позволяющие переносить фрагменты чужеродных нуклеиновых кислот.

[0121] Описанные в настоящем документе композиции могут быть очищены. Очищенные композиции содержат по меньшей мере приблизительно 60% по массе (сухой массе) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат содержит по меньшей мере приблизительно 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% или более по массе представляющего интерес соединения. Чистоту измеряют посредством любого подходящего стандартного способа, например посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле.

[0122] Термин "выделенный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок по сути не содержат других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Они могут находиться, например, в гомогенном состоянии и могут находиться либо в сухом, либо в водном растворе. Чистоту и однородность в типичном случае определяют с помощью методик аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом молекул, присутствующим в препарате, является по сути очищенным.

[0123] Используемый в настоящем документе термин "клетка" относится к клетке, выполняющей метаболическую или другую функцию, достаточную для сохранения или репликации ее геномной ДНК. Клетка может быть идентифицирована с помощью хорошо известных в уровне техники способов, включая, например, наличие интактной мембраны, окрашивание определенным красителем, способность производить потомство или, в случае гамет, способность объединяться со второй гаметой для получения жизнеспособного потомства. Клетки могут включать прокариотические и эукариотические клетки. Прокариотические клетки включают без ограничения бактерии. Эукариотические клетки включают без ограничения дрожжевые клетки и клетки, полученные из растений и животных, например клетки млекопитающих, насекомых (например, сподоптеры), и клетки человека.

[0124] Термины "ингибитор", "репрессор", или "антагонист", или "отрицательный регулятор" взаимозаменяемо относятся к веществу, которое приводит к заметно более низкому уровню экспрессии или активности по сравнению с контролем. Ингибированная экспрессия или активность может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или меньше относительно таковых в контроле. В определенных случаях ингибирование является 1,5-кратным, 2-кратным, 3-кратным, 4-кратным, 5-кратным, 10-кратным или более сильным по сравнению с контролем. "Ингибитор" представляет собой

пептид, siRNA (например, shRNA, miRNA, snoRNA), соединение или малую молекулу, которые ингибируют клеточную функцию (например, репликацию), например путем связывания, частичного или полного блокирования стимуляции, уменьшения, предотвращения или задержки активации или инактивации, десенсibilизации или ингибирования передачи сигналов, экспрессии генов или ферментативной активности, необходимой для активности белка.

[0125] "Фармацевтическая композиция" представляет собой состав, содержащий описанную в настоящем документе композицию (например, описанный в настоящем документе димерный белок) в форме, подходящей для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция находится в нерасфасованном виде или в стандартной лекарственной форме. Стандартная лекарственная форма представляет собой любую из множества форм, в том числе, например, лиофилизированный состав, капсулу, пакет для внутривенной инфузии, таблетку, одиночную помпу на аэрозольном ингаляторе или флакон. Количество активного ингредиента (например, состава раскрытой нуклеиновой кислоты) в однократной дозе композиции является эффективным количеством и варьируется в зависимости от конкретного применяемого лечения. Специалисту в данной области понятно, что иногда необходимо вносить рутинные изменения в дозу в зависимости от возраста и состояния пациента. Доза будет также зависеть от пути введения. Предусмотрено множество путей, в том числе пероральный, легочный, ректальный, парентеральный, чрескожный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, ингаляционный, трансбуккальный, сублингвальный, внутриплевральный, интратекальный, интраназальный и т. п. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения по настоящему изобретению включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы.

[0126] Используемое в настоящем документе выражение "фармацевтически приемлемый" относится к таким соединениям, анионам, катионам, материалам, композициям, носителям и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями человеческого организма и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

[0127] "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" означает вспомогательное вещество, используемое при получении фармацевтической композиции, которая в целом безопасна, нетоксична и не является нежелательной ни с биологической, ни с иной точек зрения, и включает вспомогательное вещество, приемлемое для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. Фраза "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество", используемая в описании и пунктах формулы изобретения, включает как одно, так и более чем одно такое вспомогательное вещество. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых

вспомогательных веществ доступно в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mask Pub. Co., N.J. 1991). Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества в терапевтических композициях могут содержать жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие средства, рН буферные вещества и тому подобное, могут присутствовать в таких носителях.

[0128] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению составляют таким образом, чтобы она отвечала требованиям предполагаемого способа введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (местное) и трансмукозальное введение.

[0129] Составы, пригодные для перорального введения, могут состоять из (a) жидких растворов, таких как эффективное количество упакованной нуклеиновой кислоты, суспендированной в разбавителях, таких как вода, солевой раствор или PEG 400; (b) капсул, саше или таблеток, каждая из которых содержит предварительно определенное количество активного ингредиента в виде жидкостей, твердых веществ, гранул или желатина; (c) суспензий в соответствующей жидкости и (d) подходящих эмульсий. Таблетированные формы могут включать одно или несколько из лактозы, сахарозы, маннита, сорбита, фосфатов кальция, кукурузного крахмала, картофельного крахмала, микрокристаллической целлюлозы, желатина, коллоидного диоксида кремния, талька, стеарата магния, стеариновой кислоты и других вспомогательных веществ, окрашивающих веществ, наполнителей, связующих веществ, разбавителей, буферных средств, увлажняющих средств, консервантов, ароматизаторов, красителей, разрыхляющих средств и фармацевтически совместимых носителей. Формы таблеток для рассасывания могут содержать активный ингредиент в ароматизаторе, например сахарозе, также как и пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или эмульсии сахарозы и аравийской камеди, гели и т. п., содержащие в дополнение к активному ингредиенту носители, известные в уровне техники.

[0130] Фармацевтические композиции также могут включать большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (такие как функционализированная латексом сефароза(ТМ), агароза, целлюлоза и т. п.), полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и липидные агрегаты (такие как капли масла или липосомы). Кроме того, эти носители могут действовать как иммуностимулирующие средства (т. е. адъюванты).

[0131] Пригодные составы для ректального введения включают, например, суппозитории, которые состоят из упакованной нуклеиновой кислоты с основой для суппозитория. Пригодные основы для суппозитория включают природные или синтетические триглицериды или парафиновые углеводороды. Кроме того, также

возможно использовать желатиновые ректальные капсулы, которые состоят из комбинации выбранного соединения с основанием, включая, например, жидкие триглицериды, полиэтиленгликоли и парафиновые углеводороды.

[0132] Составы, пригодные для парентерального введения, такого как, например, внутрисуставное (введение в суставы), внутривенное, внутримышечное, внутриопухоловое, внутрикожное, внутривнутрибрюшинное и подкожное введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. При осуществлении на практике настоящего изобретения композиции можно вводить, например, путем внутривенной инфузии, перорально, местно, внутривнутрибрюшинно, внутривнутрипузырно или интратекально. Парентеральное введение, пероральное введение и внутривенное введение являются предпочтительными способами введения. Составы соединений могут быть представлены в запечатанных контейнерах на однократную или многократные дозы, таких как ампулы и флаконы.

[0133] Растворы или суспензии, которые применяют для парентерального, интрадермального или подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Уровень pH можно регулировать посредством кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения можно заключить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы многократного использования, сделанные из стекла или пластика.

[0134] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью многих хорошо известных способов, используемых в настоящее время для химиотерапевтического лечения. Например, для лечения видов рака композицию по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в опухоль, вводить в кровоток или в полости тела, принимать перорально или вводить через кожу с помощью пластырей. Выбранная доза должна быть достаточной для эффективного лечения, но не настолько высокой, чтобы вызвать неприемлемые побочные эффекты. Статус болезненного состояния (например, рак, предрак и т. п.) и состояние здоровья пациента предпочтительно следует тщательно контролировать во время лечения и в течение рационального периода времени после лечения.

[0135] Используемый в настоящем документе термин "монотерапия" относится к

введению одного активного или терапевтического соединения нуждающемуся в этом субъекту. Предпочтительно монотерапия будет включать введение терапевтически эффективного количества активной композиции (например, пептида TWIST, пептида TWIST, связанного с носителем для доставки, слитого белка, включающего пептид TWIST, или любой композиции, описанной в настоящем документе). Например, в настоящем документе может быть описана монотерапия рака с помощью одной из композиций, описанных в настоящем документе, вводимой субъекту, нуждающемуся в лечении рака. Монотерапия может быть противопоставлена комбинированной терапии, при которой вводят комбинацию нескольких активных композиций (например, несколько композиций, описанных в настоящем документе), при этом предпочтительно каждый компонент комбинации присутствует в терапевтически эффективном количестве. Монотерапия композицией, описанной в настоящем документе, может быть более эффективной, чем комбинированная терапия, для достижения необходимого биологического эффекта.

[0136] Используемый в настоящем документе термин "комбинированная терапия", или "совместная терапия", или "совместное введение" включает введение композиции, описанной в настоящем документе, и по меньшей мере второго средства как части конкретной схемы лечения, предназначенной для обеспечения благоприятного эффекта от совместного действия этих терапевтических средств. Благоприятный эффект комбинации может включать без ограничения фармакокинетическое или фармакодинамическое совместное действие, получаемое от комбинации терапевтических средств. Введение таких терапевтических средств в комбинации обычно осуществляют в течение определенного периода времени (обычно минут, часов, дней или недель в зависимости от выбранной комбинации). "Комбинированная терапия" может быть, но обычно не предназначена для включения введения двух или более из этих терапевтических средств как части отдельных схем монотерапии, которые случайно и произвольно приводят к комбинациям, описанным в настоящем документе.

[0137] В некоторых вариантах осуществления совместное введение включает введение одного активного средства в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 часов после введения второго активного средства. Совместное введение включает введение двух активных средств одновременно, почти одновременно (например, в течение приблизительно 1, 5, 10, 15, 20 или 30 минут относительно друг друга) или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления совместное введение может быть осуществлено путем совместного составления, т. е. получения одной фармацевтической композиции, включающей оба активных средства. В некоторых вариантах осуществления активные средства могут быть составлены отдельно. В другом варианте осуществления активные и/или вспомогательные средства могут быть связаны или конъюгированы друг с другом. В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с видами лечения рака (например, рака предстательной железы, кастрационно-резистентного рака

предстательной железы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, рака легкого, плоскоклеточной карциномы (например, рака головы, шеи или пищевода), колоректального рака, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, В-клеточной лимфомы или множественной миеломы), такими как хирургическое вмешательство или с другими видами лечения, которые, как известно, применимы при лечении вирусных заболеваний (например, ассоциированного с герпесвирусной инфекцией заболевания, или ассоциированного с инфекцией, вызванной вирусом гепатита, заболевания, или ассоциированного с инфекцией, вызванной HIV, заболевания).

[0138] "Комбинированная терапия" охватывает введение таких терапевтических средств последовательно, где каждое терапевтическое средство вводят в разное время, а также введение таких терапевтических средств или по меньшей мере двух из терапевтических средств практически одновременно. Практически одновременное введение можно осуществлять, например, путем введения субъекту одной капсулы, содержащей фиксированное значение каждого терапевтического средства, или нескольких отдельных капсул для каждого терапевтического средства. Последовательное или практически одновременное введение каждого терапевтического средства может быть осуществлено любым подходящим путем, включая без ограничения пероральные пути, внутривенные пути, внутримышечные пути и прямую абсорбцию через ткани слизистой оболочки. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, выбранное первое терапевтическое средство из комбинации можно вводить путем внутривенной инъекции, в то время как другие терапевтические средства из комбинации можно вводить перорально. В качестве альтернативы, например, все терапевтические средства можно вводить перорально или все терапевтические средства можно вводить путем внутривенной инъекции. Последовательность, в которой вводят терапевтические средства, не является критически важной.

[0139] "Комбинированная терапия" также включает введение терапевтических средств, которые описаны выше, в дополнительной комбинации с другими биологически активными ингредиентами и немедикаментозными видами терапии (например, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). Если комбинированная терапия дополнительно включает немедикаментозное лечение, то немедикаментозное лечение можно проводить в любое подходящее время, пока достигается благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических средств и немедикаментозного лечения. Например, в соответствующих случаях благоприятный эффект все еще достигается, когда немедикаментозное лечение временно отменяется при введении терапевтических средств, возможно, на дни или даже недели.

[0140] Описанную в настоящем документе композицию можно вводить в комбинации со вторым химиотерапевтическим средством. Второе химиотерапевтическое средство (также называемое антинеопластическим средством или антипролиферативным средством) может представлять собой алкилирующее средство; антибиотик;

антиметаболит; дезинтоксикационное средство; интерферон; поликлональное или моноклональное антитело; ингибитор EGFR; ингибитор HER2; ингибитор гистондеацетилазы; гормон; ингибитор митоза; ингибитор MTOR; ингибитор мультикиназы; ингибитор серин/треонинкиназы; ингибиторы тирозинкиназы; ингибитор VEGF/VEGFR; таксан или производное таксана, ингибитор ароматазы, антрациклин, лекарственное средство, нацеленное на микротрубочки, лекарственное средство, представляющее собой яд для топоизомеразы, ингибитор молекулярной мишени или фермента (например, киназы или протеинметилтрансферазы), лекарственное средство, представляющее собой аналог цитидина, или любое химиотерапевтическое, противобластомное или антипролиферативное средство, указанное по адресу www.cancer.org/docroot/cdg/cdg_0.asp.

[0141] "Противораковая терапия" используется в соответствии с ее обычным значением и относится к терапии, необязательно соответствующей схеме, обладающей противобластомными свойствами или способностью ингибировать рост или пролиферацию клеток.

[0142] "Противораковое средство" используется в соответствии с ее обычным значением и относится к композиции (например, соединению, лекарственному средству, антагонисту, ингибитору, модулятору), обладающей противобластными свойствами или способностью ингибировать рост или пролиферацию клеток. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой определенное в настоящем документе средство, применимое в способах лечения рака. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой средство, одобренное FDA или аналогичным регулирующим органом страны, отличной от США, для лечения рака.

[0143] Противораковые средства, представленные ниже, приведены для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противораковое средство выбрано из приведенных ниже списков. В некоторых вариантах осуществления выбирают более одного противоракового средства, например два, три, четыре или пять противораковых средств, для выполнения их предполагаемой функции. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой гетерокомплекс IL-15 (например, GenBank AAX37025)/IL-15Ra (например, GenBank AAP69528.1) (например, гетерокомплексы IL-15/IL-Ra, раскрытые в WO 2007/001677 и WO20007/084342 и/или кодируемые SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой антитело к PD-1 или другой ингибитор PD-1. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD-1, PD-L1 и PD-L2 известны из уровня техники и могут применяться в комбинации с CAR по настоящему изобретению, описанными в настоящем документе. Например, ниволумаб (также называемый BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4,

которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с PD-1, раскрыты в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой моноклональное гуманизированное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела к PD-1 раскрыты в WO2009/101611. Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб и также называемый MK03475; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела к PD-1 раскрыты в US 8354509 и WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PDL1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой человеческое Fc-оптимизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела к PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и публикации заявки на патент США № 20120039906. Другие средства, связывающиеся с PD-L1, включают YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелой и легкой цепей показаны под SEQ ID NO 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1 105 (также обозначаемое как BMS-936559 и, например, средства, связывающиеся с PD-L1, раскрыты в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO2010/027827 и WO2011/066342) представляет собой растворимый рецептор на основе продукта слияния PD-L2 и Fc, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1. Другие антитела к PD-1 включают AMP 514 (Amplimmune), среди прочих, например, антитела к PD-1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой радиолиганд, такой как без ограничения ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 (оксодотреотид лютеция (117Lu)). В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой противораковую вакцину.

[0144] В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой соединение, влияющее на модификации гистонов, такое как ингибитор HDAC. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство выбрано из группы, состоящей из химиотерапевтических средств (таких как 2CdA, 5-FU, 6-меркаптопурин, 6-TG, Абрахане™, Accutane®, Actinomycin-D, Adriamycin®, Alimta®, политрансретиноевая кислота, аметоптерин, Ara-C, азацитадин, BCNU, Blenoxane®, Camptosar®, CeeNU®, клофарабин, Clolar™, Cytosan®, гидрохлорид даунорубицина, DaunoXome®, Dacogen®, DIC, Doxil®, Ellence®, Eloxatin®, Emcyt®, фосфат этопозиды, Fludara®, FUDR®, Gemzar®, Gleevec®, гексаметилмеламин, Hycamtin®, Hydrea®, Idamycin®, Ifex®, иксабепилон, Ixempra®, L-аспарагиназа, Leukeran®, липосомальный Ara-C, L-PAM, лизодрен, Matulane®, митрацин, митомицин-C, Myleran®, Navelbine®, Neutrexin®, нилотиниб, Nipent®, азотистый иприт, Novantrone®, Oncaspar®, Panretin®, Paraplatin®, Platinol®, пролифепроспан 20 с имплантатом кармустина, Sandostatin®, Targretin®, Tassigna®, Taxotere®, Temodar®, TESPА, Trisenox®, Valstar®, Velban®,

Vidaza™, винкристина сульфат, VM 26, Xeloda® и Zanosar®); биологических средств (таких как альфа-интерферон, бацилла Кальметта-Герена, Веххар®, Campath®, Ergamisol®, эрлотиниб, Herceptin®, интерлейкин-2, Iressa®, леналидомид, Mylotarg®, Ontak®, Pegasys®, Revlimid®, Rituxan®, Tarceva™, Thalomid®, Tykerb®, Velcade® и Zevalin™); кортикостероидов (таких как дексаметазона натрия фосфат, DeltaSone® и Delta-Cortef®); гормональных видов терапии (таких как Arimidex®, Aromasin®, Casodex®, Cytadren®, Eligard®, Eulexin®, Evista®, Faslodex®, Femara®, Halotestin®, Megace®, Nilandron®, Nolvadex®, Plenaxis™ и Zoladex®) и радиофармпрепаратов (таких как Iodotope®, Metastron®, Phosphocol® и Samarium SM-153).

[0145] В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство (также называемое антинеопластическим средством или антипролиферативным средством), выбранное из группы, состоящей из алкилирующего средства; антибиотика; антиметаболита; дезинтоксикационного средства; интерферона; поликлонального или моноклонального антитела; ингибитора EGFR; ингибитора HER2; ингибитора гистондеацетилазы; гормона; ингибитора митоза; ингибитора MTOR; ингибитора мультикиназы; ингибитора серин/треонинкиназы; ингибиторов тирозинкиназы; ингибитора VEGF/VEGFR; таксана или производного таксана, ингибитора ароматазы, антрациклина, лекарственного средства, нацеленного на микротрубочки, лекарственного средства, представляющего собой яд для топоизомеразы, ингибитора молекулярной мишени или фермента (например, киназы или протеинметилтрансферазы), лекарственного средства, представляющего собой аналог цитидина, или любого химиотерапевтического, противобластного или антипролиферативного средства, указанного по адресу www.cancer.org/docroot/cdg/cdg_0.asp.

[0146] Иллюстративные алкилирующие средства включают без ограничения циклофосфамид (Cytoxan; Neosar); хлорамбуцил (Лейкеран); мелфалан (Алкеран); кармустин (BiCNU); бусульфан (Busulfex); ломустин (CeeNU); дакарбазин (DTIC-Dome); оксалиплатин (Элоксатин); кармустин (Gliadel); ифосфамид (Ifex); мехлорэтамин (Mustargen); бусульфан (Милеран); карбоплатин (Paraplatin); цисплатин (CDDP; Platinol); темозоломид (Temodar); тиотепа (Thioplex); бендамустин (Treanda) или стрептозоцин (Zanosar).

[0147] Иллюстративные антибиотики включают без ограничения доксорубицин (Adriamycin); липосомальный доксорубицин (Doxil); митоксантрон (Novantrone); блеомицин (Blenoxane); даунорубицин (Cerubidine); липосомальный даунорубицин (DaunoXome); дактиномицин (Космеген); эпирубицин (Ellence); идарубицин (Ellence); пликамицин (Mithracin); митомицин (Mutamycin); пентостатин (Nipent); или валрубицин (Valstar).

[0148] Иллюстративные антиметаболиты включают без ограничения фторурацил (Adrucil); капецитабин (Кселода); гидроксимочевина (Гидреа); меркаптопурин (Purinethol); пеметрексед (Алимта); флударабин (Fludara); неларабин (Arranon); кладрибин

(Кладрибин Novaplus); клофарабин (Clolar); цитарабин (Цитозар-U); децитабин (Дакоген); липосомальный цитарабин (DepoCyt); гидроксимочевина (Droxia); пралатрексат (Folotyn); флоксуридин (FUDR); гемцитабин (Гемзар); кладрибин (Leustatin); флударабин (Oforta); метотрексат (MTX; Rheumatrex); метотрексат (Trexall); тиогуанин (Tabloid); TS-1 или цитарабин (Tarabine PFS).

[0149] Иллюстративные детоксицирующие средства включают без ограничения амифостин (Ethyol) или месну (Mesnex).

[0150] Иллюстративные интерфероны включают без ограничения интерферон альфа-2b (Intron A) или интерферон альфа-2a (Roferon-A).

[0151] Иллюстративные поликлональные или моноклональные антитела включают без ограничения трастузумаб (Герцептин); офатумумаб (Arzerra); бевацизумаб (Авастин); ритуксимаб (Rituxan); цетуксимаб (Эрбитукс); панитумумаб (Вектибикс); тозитумомаб/йод131 тозитумомаб (Bexxar); алемтузумаб (Campath); ибритумомаб (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin); гемтузумаб (Mylotarg); экулизумаб (Soliris) или деносумаб.

[0152] Иллюстративные ингибиторы EGFR включают без ограничения gefitinib (Иресса); lapatinib (Тукерб); cetuximab (Эрбитукс); erlotinib (Тарсева); panitumumab (Вектибикс); PKI-166; canertinib (CI-1033); matuzumab (Emd7200) или EKV-569.

[0153] Иллюстративные ингибиторы HER2 включают без ограничения трастузумаб (Герцептин); lapatinib (Тукерб) или AC-480.

[0154] Иллюстративные ингибиторы гистондеацетилазы включают без ограничения vorinostat (Золинза).

[0155] Иллюстративные гормоны включают без ограничения tamoxifen (Soltamox; Nolvadex); raloxifene (Evista); megestrol (Megace); leuprorelin (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur); fulvestrant (Faslodex); letrozole (Femara); triptorelin (Trelstar LA; Trelstar Depot); exemestane (Aromasin); goserelin (Zoladex); bicalutamide (Casodex); anastrozole (Arimidex); flutamide (Androxy; Halotestin); medroxyprogesterone (Provera; Depo-Provera); estramustine (Emcyt); flutamide (Eulexin); toremifene (Fareston); degarelix (Firmagon); nilutamide (Nilandron); abiraterone (Plenaxis); или testosterone (Teslac).

[0156] Иллюстративные митотических ингибиторов включают без ограничения paclitaxel (Taxol; Onxol; Abrahane); docetaxel (Taxotere); vincristine (Oncovin; Vincasar PFS); vinorelbine (Velban); etoposide (Toposar; Etopophos; VePesid); teniposide (Vumon); ixabepilone (Ixempra); nocodazole; epotilon; vinorelbine (Navelbine); camptothecin (CPT); irinotecan (Camptosar); topotecan (Hycamtin); amacrine или lamellarin D (LAM-D).

[0157] Иллюстративные ингибиторов mTOR включают без ограничения everolimus (Afinitor) или temsirolimus (Torisel); rapamun, ridaforolimus; или AP23573.

[0158] Иллюстративные ингибиторов мультикиназы включают без ограничения sorafenib (Nexavar); sunitinib (Sutent); BIBW 2992; E7080; Zd6474; PKC-412; motesanib; или AP24534.

[0159] Иллюстративные ингибиторы серин/треонинкиназы включают без ограничения рубоксистаурин; эрила/эасудила гидрохлорид; флавопиридол; Pkc412; бриостатин; KAI-9803; SF1126; или PD 332991.

[0160] Иллюстративные ингибиторы тирозинкиназы включают без ограничения эрлотиниб (Tarceva); гифитиниб (Iressa); иматиниб (Gleevec); сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); трастузумаб (Герцептин); бевацизумаб (Avastin); ритуксимаб (Rituxan); лапатиниб (Tykerb); цетуксимаб (Эрбитукс); панитумумаб (Вектибикс); эверолимус (Afinitor); алемтузумаб (Campath); гемтузумаб (Mylotarg); темсиролимус (Torisel); пазопаниб (Votrient); дазатиниб (Sprycel); нилотиниб (Tasigna); ваталаниб (Ptk787; ZK222584); WHI-P154; WHI-P131; AC-220; или AMG888.

[0161] Иллюстративные ингибиторы VEGF/VEGFR включают без ограничения бевацизумаб (Avastin); сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); ранибизумаб; пегаптаниб; или вандетиниб.

[0162] Иллюстративные лекарственные средства, нацеленные на микротрубочки, включают без ограничения паклитаксел, доцетаксел, винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навельбин.

[0163] Иллюстративные лекарственные средства, представляющие собой яд для топоизомеразы, включают без ограничения тенипозид, этопозид, адриамицин, камптотecin, даунорубицин, дактиномицин, митоксантрон, амсакрин, эпирубицин и идарубицин.

[0164] Иллюстративные таксаны или производные таксанов включают без ограничения паклитаксел и доцетаксол.

[0165] Иллюстративные общие химиотерапевтические, противоопухолевые, антипролиферативные средства включают без ограничения альтретамин (Hexalen); изотретиноин (Accutane; Amnesteem; Claravis; Sotret); третиноин (Vesanoid); азацитидин (Vidaza); бортезомиб (Velcade) аспарагиназа (Elspar); левамизол (Ergamisol); митотан (Lysodren); прокарбазин (Matulane); пегаспаргаза (Oncaspar); денилейкин дифтитокс (Ontak); порфимер (Photofrin); альдеслейкин (Proleukin); леналидомид (Revlimid); бексаротен (Targretin); талидомид (Thalomid); темсиролимус (Torisel); триоксид мышьяка (Trisenox); вертепорфин (Visudyne); мимозин (Leucenol); (1 М тегафур - 0,4 М 5-хлор-2,4-дигидроксипиримидин - 1 М оксонат калия) или ловастатин.

[0166] В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство или цитокин, такой как G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор).

[0167] В некоторых вариантах осуществления противораковые средства могут представлять собой стандартные химиотерапевтические комбинации, такие как без ограничения CMF (циклофосфамид, метотрексат и 5-фторурацил), CAF (циклофосфамид, адриамицин и 5-фторурацил), AC (адриамицин и циклофосфамид), FEC (5-фторурацил, эпирубицин и циклофосфамид), АСТ или АТС (адриамицин, циклофосфамид и паклитаксел), ритуксимаб, Кселода (капецитабин), цисплатин (CDDP), карбоплатин, TS-1

(тегафур, гиместат и отастат калия при молярном соотношении 1:0,4:1), Camptothecin-11 (СРТ-11, иринотекан или Camptosar™), СНОР (циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин и преднизолон или преднизолон), R-СНОР (ритуксимаб, циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин, преднизолон или преднизолон) или CMFP (циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил и преднизолон).

[0168] В некоторых вариантах осуществления противораковые средства могут представлять собой ингибитор фермента, такого как рецепторная или нерецепторная киназа. Рецепторные и нерецепторные киназы представляют собой, например, тирозинкиназы или серин/треонинкиназы. Описанные в настоящем документе ингибиторы киназы представляют собой малые молекулы, полинуклеиновые кислоты, полипептиды или антитела. Иллюстративные ингибиторы киназы включают без ограничения бевацизумаб (нацелен на VEGF), BIBW 2992 (нацелен на EGFR и Erb2), цетуксимаб/эрбитукс (нацелен на Erb1), иматиниб/Gleevic (нацелен на Bcr-Abl), трастузумаб (нацелен на Erb2), гефитиниб/Iressa (нацелен на EGFR), ранибизумаб (нацелен на VEGF), пегаптаниб (нацелен на VEGF), эрлотиниб/Tarceva (нацелен на Erb1), нилотиниб (нацелен на Bcr-Abl), лапатиниб (нацелен на Erb1 и Erb2/Her2), GW-572016/дизотилац лапатиниба (нацелен на HER2/Erb2), панитумумаб/Вектибикс (нацелен на EGFR), вандетиниб (нацелен на RET/VEGFR), E7080 (множество целей, включая RET и VEGFR), Герцептин (нацелен на HER2/Erb2), PKI-166 (нацелен на EGFR), канертиниб/CI-1033 (нацелен на EGFR), сунитиниб/SU-11464/Sutent (нацелен на EGFR and FLT3), матузумаб/Emd7200 (нацелен на EGFR), ЕКВ-569 (нацелен на EGFR), Zd6474 (нацелен на EGFR и VEGFR), PKC-412 (нацелен на VEGFR и FLT3), ваталаниб/Ptk787/ZK222584 (нацелен на VEGFR), CEP-701 (нацелен на FLT3), SU5614 (нацелен на FLT3), MLN518 (нацелен на FLT3), XL999 (нацелен на FLT3), VX-322 (нацелен на FLT3), Azd0530 (нацелен на SRC), BMS-354825 (нацелен на SRC), SKI-606 (нацелен на SRC), CP-690 (нацелен на JAK), AG-490 (нацелен на JAK), WHI-P154 (нацелен на JAK), WHI-P131 (нацелен на JAK), сорафениб/Nexavar (нацелен на RAF киназу, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-β, KIT, FLT-3 и RET), дасатиниб/Sprycel (BCR/ABL и Src), AC-220 (нацелен на Flt3), AC-480 (нацелен на все белки HER, "пан-HER"), дифосфат мотесаниба (нацелен на VEGF1-3, PDGFR и c-kit), деносумаб (нацелен на RANKL, ингибирует SRC), AMG888 (нацелен на HER3) и AP24534 (множество целей, включая Flt3).

[0169] Иллюстративные ингибиторы серин/треонинкиназы включают без ограничения Rapamune (нацелен на mTOR/FRAP1), дефоролимус (нацелен на mTOR), Certican/эверолимус (нацелен на mTOR/FRAP1), AP23573 (нацелен на mTOR/FRAP1), EriI/гидрохлорид фасудила (нацелен на RHO), флавопиридол (нацелен на CDK), селициклиб/CYC202/Roscovitine (нацелен на CDK), SNS-032/BMS-387032 (нацелен на CDK), рубоксистаурин (нацелен на PKC), Pkc412 (нацелен на PKC), бриостатин (нацелен на PKC), KAI-9803 (нацелен на PKC), SF1126 (нацелен на PI3K), VX-680 (нацелен на киназу Aurora), Azd1152 (нацелен на киназу Aurora), Argy-142886/AZD-6244 (нацелен на MAP/MEK), SCIO-469 (нацелен на MAP/MEK), GW681323 (нацелен на MAP/MEK), СС-

401 (нацелен на JNK), CEP-1347 (нацелен на JNK) и PD 332991 (нацелен на CDK).

[0170] Кроме того, описанную в настоящем документе пептидную композицию можно вводить совместно с традиционными иммунотерапевтическими средствами, в том числе без ограничения иммуностимуляторы (например, бациллу Кальметта-Герена (BCG), левамизол, интерлейкин-2, альфа-интерферон и т. д.), моноклональные антитела (например, моноклональные антитела к CD20, к HER2, к CD52, к HLA-DR и к VEGF), иммунотоксины (например, конъюгат моноклонального антитела к CD33 и калихеамицина, конъюгат моноклонального антитела к CD22 и экзотоксина псевдомонады и т. д.) и радиоиммунотерапию (например, моноклональное антитело к CD20, конъюгированное с ^{111}In , ^{90}Y или ^{131}I и т. д.).

[0171] В некоторых вариантах осуществления пептидную композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить совместно с традиционными радиотерапевтическими средствами, в том числе без ограничения радионуклиды, такие как ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At и ^{212}Bi , необязательно конъюгированные с антителами, нацеленными на опухолевые антигены.

[0172] В некоторых вариантах осуществления противораковое средство, используемое в настоящем документе, относится к доксорубину, цисплатину, карбоплатину, таксанам, камптотецину или любой их комбинации.

[0173] "Субъект" или "пациент" включает млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой, например, человека или подходящее млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, мышь, крыса, собака, кошка, корова, лошадь, коза, верблюд, овца или свинья. Субъект также может представлять собой птицу или дичь. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека. Таким образом, способы применимы как для терапии человека, так и для ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления субъект или нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта с заболеванием, при котором экспрессируется лиганд NKG2D. "Заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D" представляет собой заболевание или состояние, при котором экспрессия лиганда NKG2D (например, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 и/или ULBP6) является аномальной (например, выше или ниже) по сравнению с таковой у субъекта без такого заболевания или состояния. Иллюстративное заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, включает без ограничения рак, аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления субъект или нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта с раком или субъекта с предраковым состоянием. В некоторых вариантах осуществления у нуждающегося в этом субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления субъект или нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта с аутоиммунным заболеванием.

[0174] Термин "аутоиммунное заболевание" относится к нарушениям, где иммунная система млекопитающего развивает гуморальный или клеточный иммунный

ответ на собственную ткань или на антигены, которые не являются вредными по своей природе для млекопитающего, тем самым вызывая повреждение ткани у такого млекопитающего. Симптомы и степень тяжести варьируются от пациента к пациенту. Кроме того, клинические признаки заболевания у пациента резко варьируются со временем.

[0175] Примеры аутоиммунных заболеваний включают без ограничения системную красную волчанку, ревматоидный артрит и диабет I типа. К аутоиммунным заболеваниям также относятся острый гломерулонефрит, болезнь Аддисона, идиопатический гипопаратиреоз с началом во взрослом возрасте (АОИ), тотальная алопеция, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилоартрит, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная гемолитическая анемия, болезнь Бехчета, целиакия, хронический активный гепатит, CREST-синдром, болезнь Крона, болезнь, дерматомиозит, дилатационная кардиомиопатия, синдром эозинофилии-миалгии, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гигантоклеточный артериит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, гемохроматоз, пурпура Шенлейна-Геноха, идиопатическая IgA-нефропатия, инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит, синдром Ламберта-Итона, линейный IgA-дерматоз, красная волчанка, рассеянный склероз, тяжелая миастения, миокардит, нарколепсия, некротизирующий васкулит, синдром неонатальной волчанки (NLE), нефротический синдром, пемфигоид, пузырчатка, полимиозит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, быстро прогрессирующий острый гломерулонефрит (RPGN), синдром Рейтера, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, синдром скованного человека, тиреоидит и язвенный колит. Это не исчерпывающий список, а скорее он предназначен для демонстрации того, что аутоиммунные реакции представляют собой широкий спектр клинических явлений. Иллюстративные заболевания в этой области, такие как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, смешанное заболевание соединительной ткани и APLS, более подробно обсуждаются ниже с целью обеспечения некоторого понимания проблем, связанных с клинической диагностикой и лечением этих инвалидизирующих и потенциально смертельных нарушений.

[0176] В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, колит, целиакию, рассеянный склероз, очаговую алопецию, диабет I типа, хроническую обструктивную болезнь легких, атеросклероз или метаболический синдром, ассоциированный с диабетом 2 типа.

[0177] Используемый в настоящем документе термин "рак" относится ко всем видам рака, новообразованиям или злокачественным опухолям, обнаруженным у млекопитающих, в том числе видам лейкоза, лимфомам, меланомам, нейроэндокринным опухолям, карциномам и саркомам. Иллюстративные виды рака, которые можно лечить с помощью композиции, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в настоящем документе, включают лимфому, саркому, рак мочевого пузыря, рак кости, опухоль головного мозга, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак пищевода, рак

желудка, рак головы и шеи, рак почки, миелому, рак щитовидной железы, лейкоз, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, трижды негативный, ER-положительный, ER-отрицательный, устойчивый к химиотерапии, устойчивый к герцептину, HER2-положительный, устойчивый к доксорубину, устойчивый к тамоксифену, протоковую карциному, лобулярную карциному, первичный, метастатический), рак яичника, рак поджелудочной железы, рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному), рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, аденокарциному, крупноклеточную карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциноид, саркому), мультиформную глиобластому, глиому, меланому, рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, глиобластому, рак яичника, рак легкого, плоскоклеточную карциному (например, головы, шеи или пищевода), колоректальный рак, лейкоз, острый миелоидный лейкоз, лимфому, В-клеточную лимфому или множественную миелому. Дополнительные примеры включают рак щитовидной железы, эндокринной системы, головного мозга, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, головы и шеи, пищевода, печени, почки, легкого, немелкоклеточный рак легкого, меланому, мезотелиому, яичника, саркома, желудка, матки или медуллобластому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, глиому, мультиформную глиобластому, рак яичника, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, рак, злокачественную инсулиному поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предраковые поражения кожи, рак яичка, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественную гиперкальциемию, рак эндометрия, рак коры надпочечников, новообразования эндокринной или экзокринной части поджелудочной железы, медулярный рак щитовидной железы, медулярную карциному щитовидной железы, меланому, колоректальный рак, папиллярный рак щитовидной железы, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Педжета соска, листовидные опухоли, лобулярную карциному, протоковую карциному, рак звездчатых клеток поджелудочной железы, рак звездчатых клеток печени или рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, представляет собой рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак почки, карциному носоглотки (NPC), рак предстательной железы, меланому, рак плазматических клеток, лейкоз, лимфому, глиому или нейробластому.

[0178] Термин "лейкоз" в широком смысле относится к прогрессирующим злокачественным заболеваниям органов кроветворения и обычно характеризуется искаженной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Лейкоз обычно клинически классифицируют на основе (1)

продолжительности и характера заболевания: на острый или хронический; (2) типа задействованной клетки: на миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный) или моноцитарный; и (3) увеличения или отсутствия увеличения количества аномальных клеток в крови: на лейкемический или алейкемический (сублейкемический). Иллюстративные виды лейкоза, которые можно лечить с помощью композиции, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем документе, включают, например, острый нелимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз, хронический гранулоцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, алейкемический лейкоз, лейкоцитемический лейкоз, базофильный лейкоз, бластноклеточный лейкоз, лейкоз крупного рогатого скота, хронический миелоцитарный лейкоз, лейкоз кожи, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, волосатоклеточный лейкоз, гемобластный лейкоз, гемоцитобластный лейкоз, гистиоцитарный лейкоз, лейкоз стволовых клеток острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфатический лейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидный лейкоз, лимфосаркомоклеточный лейкоз, тучноклеточный лейкоз, мегакариоцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Негели, плазмоклеточный лейкоз, множественную миелому, плазмоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз клеток Ридера, лейкоз Шиллинга, лейкоз стволовых клеток, сублейкемический лейкоз или лейкоз недифференцированных клеток.

[0179] Термин "саркома" обычно относится к опухоли, которая состоит из вещества, подобного эмбриональной соединительной ткани, и обычно состоит из плотно упакованных клеток, погруженных в фибриллярное или гомогенное вещество. Саркомы, которые можно лечить с помощью композиции, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в настоящем документе, включают хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, жировую саркому, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амелобластную саркому, ботриоидную саркому, хлорому, хориокарциному, эмбриональную саркому, саркому, представляющую собой опухоль Вильмса, эндометриальную саркому, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластную саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную пигментную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому из В-клеток, лимфому, иммунобластную саркому из Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому из клеток Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, саркому, представляющую собой злокачественную мезенхимому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, серокистозную саркому, синовиальную саркому или телеангиоэктатическую саркому.

[0180] Под термином "меланома" понимают опухоль, возникающую из

меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить с помощью композиции, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в настоящем документе, включают, например, акральную-лентигинозную меланому, амеланотическую меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, меланому S91, меланому Хардинга-Пасси, ювенильную меланому, злокачественную лентигино-меланому, злокачественную меланому, узловую меланому, подногтевую меланому или поверхностно распространяющуюся меланому.

[0181] "Рак молочной железы" предусматривает все формы рака молочной железы. Рак молочной железы может предусматривать первичный эпителиальный рак молочной железы. Рак молочной железы может предусматривать виды рака, при которых молочная железа поражена другими опухолями, такими как лимфома, саркома или меланома. Рак молочной железы может предусматривать карциному молочной железы, протоковую карциному молочной железы, лобулярную карциному молочной железы, недифференцированную карциному молочной железы, филодную цистосаркому молочной железы, ангиосаркому молочной железы и первичную лимфому молочной железы. Рак молочной железы может предусматривать рак молочной железы стадии I, II, IIIA, IIIB, IIIC и IV. Протоковая карцинома молочной железы может предусматривать инвазивную карциному, инвазивную карциному *in situ* с преобладанием внутрипротокового компонента, воспалительный рак молочной железы и протоковую карциному молочной железы с гистологическим типом, выбранным из группы, состоящей из комедонного, муцинозного (коллоидного), медуллярного, медуллярного с лимфоцитарным инфильтратом, папиллярного, скirroзного и тубулярного. Лобулярная карцинома молочной железы может предусматривать инвазивную лобулярную карциному с преобладанием компонента *in situ*, инвазивную лобулярную карциному и инфильтрирующую лобулярную карциному. Рак молочной железы может предусматривать болезнь Педжета, болезнь Педжета с внутрипротоковой карциномой и болезнь Педжета с инвазивной протоковой карциномой. Рак молочной железы может предусматривать новообразования молочной железы, характеризующиеся гистологической и ультраструктурной гетерогенностью (например, смешанно-клеточные типы).

[0182] Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать семейный рак молочной железы. Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать спорадический рак молочной железы. Подлежащий лечению рак молочной железы может возникать у субъекта мужского пола. Подлежащий лечению рак молочной железы может возникать у субъекта женского пола. Подлежащий лечению рак молочной железы может возникать у субъектов-женщин в период до наступления климакса или у субъектов-женщин в период климакса. Подлежащий лечению рак молочной железы может возникать у субъекта в возрасте 30 лет или старше или у субъекта моложе 30 лет. Подлежащий лечению рак молочной железы возник у субъекта в возрасте 50 лет или старше или у субъекта моложе 50 лет. Подлежащий лечению рак

молочной железы может возникать у субъекта в возрасте 70 лет или старше или у субъекта моложе 70 лет.

[0183] Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован для идентификации семейной или спонтанной мутации в BRCA1, BRCA2 или p53. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как имеющий амплификацию гена HER2/neu, сверхэкспрессирующий HER2/neu или характеризующийся низким, промежуточным или высоким уровнем экспрессии HER2/neu. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован по маркеру, выбранному из группы, состоящей из рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR), рецептора-2 эпидермального фактора роста человека, Ki-67, CA15-3, CA 27-29 и c-Met. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как рак с неизвестным статусом в отношении ER, рак, богатый в отношении ER, или рак, бедный в отношении ER. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть классифицирован как ER-отрицательный или ER-положительный. ER-типирование рака молочной железы может быть выполнено любым воспроизводимым способом. ER-типирование рака молочной железы может быть выполнено, как изложено в *Onkologie* 27: 175-179 (2004). Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как рак с неизвестным статусом в отношении PR, рак, богатый в отношении PR, или рак, бедный в отношении PR. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как PR-отрицательный или PR-положительный. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как рецептор-положительный или рецептор-отрицательный. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть типирован как ассоциированный с повышенным уровнем в крови CA 15-3 или CA 27-29 или обоих. Подлежащий лечению рак молочной железы может представлять собой "трижды негативный рак молочной железы" (TNBC) (отрицательный в отношении рецептора эстрогена [ER], отрицательный в отношении рецепторы прогестерона [PR] и отрицательный в отношении рецептора эпидермального фактора роста человека 2 [HER2]).

[0184] Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать локализованную опухоль молочной железы. Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать опухоль молочной железы, ассоциированную с отрицательным результатом биопсии сигнального лимфатического узла (SLN). Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать опухоль молочной железы, ассоциированную с положительным результатом биопсии сигнального лимфатического узла (SLN). Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать опухоль молочной железы, ассоциированную с одним или несколькими положительными подмышечными лимфатическими узлами, где подмышечные лимфатические узлы были стадированы любым применимым способом. Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать опухоль молочной железы, которая была типирована как имеющая отрицательный узловой статус (например, узел-отрицательная опухоль) или

положительный узловой статус (например, узел-положительная опухоль). Подлежащий лечению рак молочной железы может предусматривать опухоль молочной железы, которая метастазировала в другие участки тела. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть классифицирован как метастазирующий в место, выбранное из группы, состоящей из костей, легких, печени или головного мозга. Подлежащий лечению рак молочной железы может быть классифицирован в соответствии с характеристикой, выбранной из группы, состоящей из метастатического, локализованного, регионарного, местно-регионарного, местно-распространенного, отдаленного, многоцентрового, двустороннего, ипсилатерального, контралатерального, впервые диагностированного, рецидивирующего и неоперабельного рака.

[0185] Термин "карцинома" относится к злокачественному новообразованию, состоящему из эпителиальных клеток, имеющих тенденцию инфильтрировать окружающие ткани и вызывать метастазы. Иллюстративные карциномы, которые можно лечить с помощью композиции, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в настоящем документе, включают, например, медуллярную карциному щитовидной железы, семейную медуллярную карциному щитовидной железы, ацинарную карциному, ацинозную карциному, аденокистозную карциному, аденоидно-кистозную карциному, аденоматозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярноклеточную карциному, базалиому, базальноклеточную карциному, базалоидную карциному, базоплоскоклеточную карциному, бронхоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, церебриформную карциному, холангиоцеллюлярную карциному, хорионическую карциному, коллоидную карциному, комедонную карциному, карциному тела, решетчатую карциному, панцирную карциному, карциному кожи, цилиндрическую карциному, карциному из цилиндрических клеток, карциному протока, протоковую карциному, твердую карциному, эмбриональную карциному, энцефалоидную карциному, эпидермоидную карциному, эпителиальную аденоидную карциному, экзофитную карциному, карциному, происходящую из язвы, фиброзную карциному, желатиниформную карциному, желатиноидную карциному, карциному из гигантских клеток, гигантоклеточную карциному, железистую карциному, гранулезноклеточную карциному, карциному волосяного матрикса, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному из клеток Гюртле, гиалиновую карциному, гипернефроидную карциному, младенческую эмбриональную карциному, карциному *in situ*, внутриэпидермальную карциному, внутриэпителиальную карциному, карциному Кромпехера, карциному Кульчицкого, крупноклеточную карциному, лентикулярную карциному, карциному хрусталика, липоматозную карциному, лобулярную карциному, лимфоэпителиальную карциному, медуллярную карциному, мозговик, меланотическую карциному, мягкую карциному, муцинозную карциному, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, слизистую карциному, карциному слизистой, миксоматозную карциному, карциному носоглотки, овсяноклеточную карциному,

оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, шиповидно-клеточную карциному, пульпозную карциному, почечно-клеточную карциному почки, резервно-клеточную карциному, саркоматодную карциному, карциному Шнейдера, скirrosную карциному, карциному мошонки, перстневидно-клеточную карциному, простую карциному, мелкоклеточную карциному, соланоидную карциному, сфероидально-клеточную карциному, веретенклеточную карциному, спонгиозную карциному, плоскоклеточную карциному, карциному из плоских клеток, нитевидную карциному, телеангиэктатическую карциному, телеангиэктодную карциному, переходно-клеточную карциному, бугристую карциному, тубулярную карциному, туберозную карциному, веррукозную карциному или ворсинчатую карциному.

[0186] Используемые в настоящем документе термины "метастаз", "метастатический" и "метастатический рак" могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к распространению пролиферативного заболевания или нарушения, например рака, из одного органа в другие несмежные орган или часть тела. Рак развивается в месте возникновения, например в молочной железе, и это место называется первичной опухолью, например первичным раком молочной железы. Некоторые раковые клетки в первичной опухоли или месте возникновения приобретают способность проникать и инфильтрировать окружающие нормальные ткани в локальной области и/или способность проникать через стенки лимфатической системы или сосудистой системы, циркулируя через данные системы в другие участки и ткани тела. Вторая клинически обнаруживаемая опухоль, образованная из раковых клеток первичной опухоли, называется метастатической или вторичной опухолью. Когда раковые клетки метастазируют, предполагается, что метастатическая опухоль и ее клетки аналогичны клеткам исходной опухоли. Таким образом, если рак легкого метастазирует в молочную железу, вторичная опухоль в молочной железе состоит из аномальных клеток легких, а не аномальных клеток молочной железы. Вторичная опухоль в молочной железе относится к метастатическому раку легкого. Таким образом, фраза "метастатический рак" относится к заболеванию, при котором у субъекта имеется или имела первичная опухоль и имеется одна или несколько вторичных опухолей. Фразы "неметастатический рак" или "субъекты с неметастатическим раком" относятся к заболеваниям, при которых у субъектов имеется первичная опухоль, но нет одной или нескольких вторичных опухолей. Например, метастатический рак легкого относится к заболеванию у субъекта с первичной опухолью легкого или с наличием в анамнезе первичной опухоли легкого и с одной или более вторичными опухолями во втором местоположении или нескольких местоположениях, например в молочной железе.

[0187] Подлежащий лечению рак может быть стадирован в соответствии с системой классификации TNM Американского объединенного комитета по онкологическим заболеваниям (AJCC), где опухоли (T) присвоена стадия TX, T1, T1mic, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4c, или T4d; и где регионарным лимфатическим

узлам (N) присвоена стадия NX, N0, N1, N2, N2a, N2b, N3, N3a, N3b, или N3c; и где отдаленным метастазам (M) может быть присвоена стадия MX, M0 или M1. Подлежащий лечению рак может быть стадирован в соответствии с классификацией Американского объединенного комитета по онкологическим заболеваниям (AJCC) как относящийся к стадии I, стадии IА, стадии IВ, стадии IIIА, стадии IIIВ, стадии IIIС или стадии IV. Подлежащему лечению раку может быть присвоена степень в соответствии с классификацией AJCC, такая как степень GX (например, если степень не может быть оценена), степень 1, степень 2, степень 3 или степень 4. Подлежащий лечению рак может быть стадирован в соответствии с патологической классификацией AJCC: (pN) of pNX, pN0, PN0 (I-), PN0 (I+), PN0 (mol-), PN0 (mol+), PN1, PN1(mi), PN1a, PN1b, PN1c, pN2, pN2a, pN2b, pN3, pN3a, pN3b, или pN3c..

[0188] Подлежащий лечению рак может предусматривать опухоль, которая, как определено, имеет диаметр менее или равный приблизительно 2 сантиметрам. Подлежащий лечению рак может предусматривать опухоль, которая, как определено, имеет диаметр от приблизительно 2 до приблизительно 5 сантиметров. Подлежащий лечению рак может предусматривать опухоль, которая, как определено, имеет диаметр более или равный приблизительно 3 сантиметрам. Подлежащий лечению рак может предусматривать опухоль, которая, как определено, имеет диаметр более 5 сантиметров. Подлежащий лечению рак можно классифицировать по микроскопическим признакам как высокодифференцированный, умеренно дифференцированный, низкодифференцированный или недифференцированный. Подлежащий лечению рак можно классифицировать по микроскопическим признакам в отношении количества митозов (например, количества клеточных делений) или ядерного плеоморфизма (например, изменения в клетках). Подлежащий лечению рак может быть классифицирован по микроскопическим признакам как ассоциированный с участками некроза (например, участками умирающих или дегенерирующих клеток). Подлежащий лечению рак может быть классифицирован как характеризующийся аномальным кариотипом, характеризующийся аномальным числом хромосом или характеризующийся одной или несколькими хромосомами с аномальным внешним видом. Подлежащий лечению рак может быть классифицирован как анеуплоидный, триплоидный, тетраплоидный или характеризующийся измененной ploидностью. Подлежащий лечению рак может быть классифицирован как имеющий хромосомную транслокацию, или делецию, или дупликацию всей хромосомы, или область делеции, дупликации или амплификации части хромосомы.

[0189] Подлежащий лечению рак можно оценить с помощью ДНК-цитометрии, проточной цитометрии или цитометрии изображений. Подлежащий лечению рак можно разделить на типы, характеризующиеся приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток на синтетической стадии клеточного деления (например, на S-фазе клеточного деления). Рак, который подлежит лечению можно разделить на типы, характеризующиеся низким содержанием фракции в S-фазе или высоким содержанием

фракции в S-фазе.

[0190] "Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", предусмотренное в настоящем документе, представляет собой количество, достаточное для достижения указанной цели (например, достижения эффекта, ради которого его вводят, лечения заболевания, снижения активности фермента, повышения активности фермента, снижения транскрипционной активности, увеличения транскрипционной активности, снижения в отношении одного или нескольких симптомов заболевания или состояния). Примером "эффективного количества" является количество, достаточное для содействия лечению, предупреждению или снижению в отношении симптома или симптомов заболевания, которое также можно называть "терапевтически эффективным количеством". "Снижение" в отношении симптома или симптомов (и грамматические эквиваленты этой фразы) означает уменьшение тяжести или частоты проявления симптома(-ов) или устранение симптома(-ов). "Профилактически эффективное количество" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое, при введении субъекту, будет обеспечивать предполагаемый профилактический эффект, например предупреждение или отсрочивание начала (или повторного возникновения) травмы, заболевания, патологии или состояния или снижение вероятности начала (или повторного возникновения) травмы, заболевания, патологии или состояния или их симптомов. Полный профилактический эффект не обязательно возникает при введении одной дозы, а может возникать только после введения ряда доз. Поэтому профилактически эффективное количество можно вводить путем одного или нескольких введений. "Количество, обеспечивающее уменьшение активности", применяемое в настоящем документе, относится к количеству антагониста (ингибитора), необходимому для уменьшения активности фермента или белка (например, фактора транскрипции) по сравнению с таковой при отсутствии антагониста. "Количество, обеспечивающее увеличение активности", применяемое в настоящем документе, относится к количеству агониста (активатора), необходимому для увеличения активности фермента или белка (например, фактора транскрипции) по сравнению с таковой при отсутствии антагониста. "Количество, обеспечивающее нарушение функции", применяемое в настоящем документе, относится к количеству антагониста (ингибитора), необходимому для нарушения функции фермента или белка (например, фактора транскрипции) по сравнению с таковой при отсутствии антагониста. "Количество, обеспечивающее увеличение функции", применяемое в настоящем документе, относится к количеству агониста (активатора), необходимому для увеличения функции фермента или белка (например, фактора транскрипции) по сравнению с таковой при отсутствии агониста. Точные количества будут зависеть от цели лечения и могут быть установлены специалистом в данной области с применением известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (том 1-3, 1992 г.); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed.,

Lippincott, Williams & Wilkins). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак.

[0191] Применяемые в настоящем документе "осуществлять лечения" или "лечить" описывают уход и присмотр за пациентом с целью побороть заболевание, состояние или нарушение и включают введение композиции, описанной в настоящем документе, для облегчения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения или устранения заболевания, состояния или нарушения. Термин "обрабатывать" также может включать обработку клетки *in vitro* или животной модели.

[0192] Применяемый в настоящем документе термин "облегчение" предназначен для описания способа, с помощью которого уменьшают тяжесть признака или симптома нарушения. Важно отметить, что признак или симптом могут быть ослаблены без устранения. Введение композиций или фармацевтических композиций по настоящему изобретению возможно приведет или может привести к устранению признака или симптома, однако, устранение не является необходимым. Следует ожидать, что эффективные дозы уменьшат выраженность и тяжесть признака или симптома. Например, обеспечивают облегчение признака или симптома нарушения, такого как рак, который может возникать в нескольких месторасположениях, если тяжесть рака уменьшается в по меньшей мере одном из нескольких месторасположений.

[0193] Применяемый в настоящем документе термин "тяжесть" предназначен для описания потенциала рака превращаться из предракового, или доброкачественного, состояния в злокачественное состояние. В качестве альтернативы или дополнения термин "тяжесть" предназначен для описания стадии рака, например, в соответствии с системой TNM (утвержденной Международным союзом по борьбе с раком (UICC) и Американским объединенным комитетом по изучению рака (AJCC)) или другими известными в данной области способами. Стадия рак относится к степени развития или тяжести рака, основанной на таких факторах, как месторасположение первичной опухоли, размер опухоли, количество опухолей и вовлечение лимфатических узлов (распространение рака в лимфатические узлы). В качестве альтернативы или дополнения слово тяжесть предназначено для описания степени злокачественности опухоли известными в уровне техники способами (см. Национальный институт рака, www.cancer.gov). Степень злокачественности опухоли представляет собой систему, применяемую для классификации раковых клеток в терминах того, насколько аномальными они выглядят под микроскопом и насколько быстро опухоль способна расти и распространяться. Принимают во внимание много факторов при определении степени злокачественности опухоли, в том числе структуру и характер роста клеток. Конкретные факторы, применяемые для определения степени злокачественности опухоли, изменяются с каждым типом рака. Термин "тяжесть" также описывает гистологическую степень злокачественности, также называемую степенью дифференциации, которая относится к тому, насколько опухолевые клетки похожи на нормальные клетки того же типа ткани (см. Национальный институт рака, www.cancer.gov). Кроме того, термин "тяжесть"

описывает степень полиморфизма ядер, которая относится к размеру и форме ядра в опухолевых клетках и проценту опухолевых клеток, которые делятся (см. Национальный институт рака, www.cancer.gov).

[0194] Термин "тяжесть" также может описывать степень, в которой опухоль секретировала факторы роста, разрушала внеклеточный матрикс, васкуляризировалась, утратила сцепление со смежными тканями или метастазировала. Кроме того, термин "тяжесть" может описывать количество месторасположений, в которые метастазировала первичная опухоль. Наконец, тяжесть может предусматривать сложность лечения опухолей различных типов и месторасположений. Например, неоперабельные опухоли, те виды рака, которые имеют больший доступ к различным системам организма (гематологические и иммунологические опухоли), и те, которые наиболее стойкие к традиционным средствам лечения, считаются наиболее тяжелыми. В таких случаях, продление продолжительности жизни субъекта и/или снижение боли, уменьшение количественного соотношения раковых клеток или ограничение клеток одной системой и улучшение в отношении стадии рака/степени злокачественности опухоли/гистологической степени злокачественности опухоли/степени полиморфизма ядер считаются такими, которые облегчают признак или симптом рака.

[0195] Применяемый в настоящем документе термин "симптом" определен как показатель заболевания, болезни, травмы или того, что в организме что-то не в порядке. Симптомы чувствует или замечает индивидуум, у которого присутствует симптом, но другие не могут легко его замечать. Другие определены как не специалисты в области охраны здоровья.

[0196] Применяемый в настоящем документе термин "признак" также определен как показатель того, что в организме что-то не в порядке. Но признаки определены как обстоятельства, которые могут видеть доктор, медсестра или другой специалист в области охраны здоровья.

[0197] Рак представляет собой группу заболеваний, которые могут вызывать возникновение любого признака или симптома. Признаки и симптомы будут зависеть от того, где находится рак, размера рака и того, насколько он влияет на близлежащие органы или структуры. Если рак распространяется (метастазирует), тогда симптомы могут появляться в других частях организма. Например, рак может также вызывать возникновение таких симптомов, как лихорадка, усталость или потеря веса. Боль может представлять собой ранний симптом некоторых видов рака, таких как рак кости или рак яичка. Но наиболее часто боль является симптомом развитой стадии заболевания. Наряду с видами рака кожи некоторые виды рака внутренних органов могут вызывать возникновение признаков на коже, которые можно увидеть. Такие изменения включают более темный (гиперпигментация), желтый (желтуха) или красный (эритема) вид кожи; зуд или чрезмерный рост волос.

[0198] В качестве альтернативы или дополнения подтипы рака проявляют специфичные признаки или симптомы. Изменения ритма опорожнения кишечника или

функции мочевого пузыря могут быть показателем рака. Длительный запор, диарея или изменение размера стула могут быть признаком рака толстого кишечника. Боль при мочеиспускании, наличие крови в моче или изменение функции мочевого пузыря (как, например, более частое или менее частое мочеиспускание) могут быть связаны с раком мочевого пузыря или раком предстательной железы.

[0199] Изменения состояния кожи или появление нового состояния кожи могут быть показателем рака. Виды рака кожи могут кровоточить и выглядеть как язвы, которые не заживают. Хроническая язва во рту может представлять собой рак ротовой полости, особенно у пациентов, которые курят, жуют табак или часто пьют алкоголь. Язвы на половом члене или влагалище могут быть признаками либо инфекции, либо ранней стадии рака.

[0200] Необычные кровотечения или выделения могут быть показателем рака. Необычное кровотечение может иметь место либо на ранней стадии, либо на развитой стадии рака. Кровь в слюне (мокроте) может быть признаком рака легкого. Кровь в стуле (или темный или черный стул) могут быть признаком рака толстого кишечника или ректального рака. Рак шейки матки или эндометрия (ткани, устилающей матку) может вызывать вагинальное кровотечение. Кровь в моче может быть признаком рака мочевого пузыря или почки. Кровавые выделения из соска могут быть признаком рака молочной железы.

[0201] Уплотнение или комок в груди или в других частях организма могут быть показателем наличия рака. Много видов рака можно тактильно почувствовать через кожу, чаще всего на груди, яичке, лимфатических узлах (железах) и мягких тканях организма. Комок или уплотнение могут представлять собой ранний или поздний признак рака. Любые комки или уплотнения могут быть показателем рака, особенно если образование является новым или выросло в размерах.

[0202] Несварение или усложненное проглатывание могут быть показателем рака. В то время как эти симптомы обычно имеют другие причины, несварение или проблемы с проглатыванием могут быть признаком рака пищевода, желудка или зева (глотки).

[0203] Недавние изменения бородавки или родинки могут быть показателем рака. Любые бородавка, родинка или веснушка, у которых меняется цвет, размер или форма или утрачивается их четкая граница, указывают на потенциальное развитие рака. Например, поражение кожи может представлять собой меланому.

[0204] Постоянный кашель или охриплость могут быть показателем рака. Кашель, который не проходит, может быть признаком рака легкого. Охриплость может быть признаком рака дыхательного горла (гортани) или щитовидной железы.

[0205] В то время как признаки и симптомы, перечисленные выше, являются более распространенными при раке, существует много других, которые менее распространены и не перечислены в настоящем документе.

[0206] Лечение рака может приводить к снижению размера опухоли. Снижение размера опухоли можно также называть "регрессией опухоли". Предпочтительно после

лечения размер опухоли будет снижен на приблизительно 5% или более по сравнению с ее размером до лечения; более предпочтительно размер опухоли снижается на приблизительно 10% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 20% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 30% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 40% или более; еще более предпочтительно снижается на приблизительно 50% или более и наиболее предпочтительно снижается на более чем приблизительно 75% или более. Размер опухоли можно измерять воспроизводимыми способами измерения. Размер опухоли можно измерять как диаметр опухоли.

[0207] Лечение рака может приводить к снижению объема опухоли. Предпочтительно после лечения объем опухоли будет снижен на приблизительно 5% или более по сравнению с ее размером до лечения; более предпочтительно объем опухоли снижается на приблизительно 10% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 20% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 30% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 40% или более; еще более предпочтительно снижается на приблизительно 50% или более и наиболее предпочтительно снижается на более чем приблизительно 75% или более. Объем опухоли можно измерять воспроизводимыми способами измерения.

[0208] Лечение рака может приводить к уменьшению количества опухолей. Предпочтительно после лечения количество опухолей будет снижено на приблизительно 5% или более по сравнению с их количеством до лечения; более предпочтительно количество опухолей снижается на приблизительно 10% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 20% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 30% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 40% или более; еще более предпочтительно снижается на приблизительно 50% или более и наиболее предпочтительно снижается на более чем приблизительно 75%. Количество опухолей можно измерять воспроизводимыми способами измерения. Количество опухолей можно измерять путем подсчета опухолей, видимых невооруженным глазом или при указанном увеличении. Предпочтительно указанное увеличение представляет собой 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

[0209] Лечение рака может приводить к уменьшению количества метастатических поражений других тканей или органов, отдаленных от первичного места расположения опухоли. Предпочтительно после лечения количество метастатических поражений будет снижено на приблизительно 5% или более по сравнению с их количеством до лечения; более предпочтительно количество метастатических поражений снижается на приблизительно 10% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 20% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 30% или более; более предпочтительно снижается на приблизительно 40% или более; еще более предпочтительно снижается на приблизительно 50% или более и наиболее предпочтительно снижается на более чем приблизительно 75%. Количество

метастатических поражений можно измерять воспроизводимыми способами измерения. Количество метастатических поражений можно измерять путем подсчета метастатических поражений, видимых невооруженным глазом или при указанном увеличении. Предпочтительно указанное увеличение представляет собой 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

[0210] Лечение рака может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции подданных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей только носитель. Предпочтительно средняя продолжительность жизни будет увеличена на более чем 30 дней; более предпочтительно на более чем 60 дней; более предпочтительно на более чем 90 дней и наиболее предпочтительно на более чем 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после начала лечения активной композицией. Увеличение средней продолжительности жизни популяции также можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого раунда лечения активной композицией.

[0211] Лечение рака может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции подданных лечению субъектов по сравнению с популяцией не подданных лечению субъектов. Предпочтительно средняя продолжительность жизни будет увеличена на более чем 30 дней; более предпочтительно на более чем 60 дней; более предпочтительно на более чем 90 дней и наиболее предпочтительно на более чем 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после начала лечения активной композицией. Увеличение средней продолжительности жизни популяции также можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого раунда лечения активной композицией.

[0212] Лечение рака может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции подданных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей монотерапию лекарственным средством, которое не является композицией, описанной в настоящем документе. Предпочтительно средняя продолжительность жизни будет увеличена на более чем 30 дней; более предпочтительно на более чем 60 дней; более предпочтительно на более чем 90 дней и наиболее предпочтительно на более чем 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Увеличение средней продолжительности жизни популяции можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после начала лечения активной композицией. Увеличение средней продолжительности жизни популяции также можно измерять, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого раунда лечения

активной композицией.

[0213] Лечение рака может приводить к уменьшению уровня смертности в популяции подданных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей только носитель. Лечение рака может приводить к уменьшению уровня смертности в популяции подданных лечению субъектов по сравнению с не подданной лечению популяцией. Лечение рака может приводить к уменьшению уровня смертности в популяции подданных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей монотерапию лекарственным средством, которое не является композицией, описанной в настоящем документе, или ее фармацевтически приемлемой солью, пролекарством на ее основе, ее метаболитом, аналогом или производным. Предпочтительно уровень смертности будет уменьшен на более чем 2%; более предпочтительно на более чем 5%; более предпочтительно на более чем 10% и наиболее предпочтительно на более чем 25%. Уменьшение уровня смертности в популяции подданных лечению субъектов можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Уменьшение уровня смертности в популяции можно измерять, например, путем расчета для популяции среднего количества смертей, связанных с заболеванием, на единицу времени после начала лечения активной композицией. Уменьшение уровня смертности в популяции также можно измерять, например, путем расчета для популяции среднего количества смертей, связанных с заболеванием, на единицу времени после завершения первого раунда лечения активной композицией.

[0214] Лечение рака может приводить к уменьшению скорости роста опухоли. Предпочтительно после лечения скорость роста опухоли будет снижена на по меньшей мере 5% по сравнению с данным значением до лечения; более предпочтительно скорость роста опухоли будет снижена на по меньшей мере 10%; более предпочтительно снижена на по меньшей мере 20%; более предпочтительно снижена на по меньшей мере 30%; более предпочтительно снижена на по меньшей мере 40%; более предпочтительно снижена на по меньшей мере 50%; еще более предпочтительно снижена на по меньшей мере 50% и наиболее предпочтительно снижена на по меньшей мере 75%. Скорость роста опухоли можно измерять любыми воспроизводимыми способами измерения. Скорость роста опухоли можно измерять в соответствии с изменением диаметра опухоли на единицу времени.

[0215] Лечение рака может приводить к уменьшению повторного роста опухоли. Предпочтительно после лечения повторный рост опухоли будет составлять менее чем 5%; более предпочтительно повторный рост опухоли будет составлять менее чем 10%; более предпочтительно менее чем 20%; более предпочтительно менее чем 30%; более предпочтительно менее чем 40%; более предпочтительно менее чем 50%; еще более предпочтительно менее чем 50% и наиболее предпочтительно менее чем 75%. Повторный рост опухоли можно измерять любыми воспроизводимыми способами измерения. Повторный рост опухоли измеряют, например, путем измерения увеличения диаметра опухоли после предшествующего уменьшения площади опухоли, которое последовало

после лечения. Уменьшение повторного роста опухоли обнаруживают по неудачному повторному возникновению опухолей после прекращения лечения.

[0216] "Приведение в контакт" применяется в соответствии с простым обычным значением и относится к способу обеспечения достаточной близости по меньшей мере двух разных видов веществ (например, химических соединений, в том числе биомолекул или клеток) для вступления в реакцию, взаимодействия или физического соприкосновения. Следует понимать, однако, что полученный в результате продукт реакции можно получать непосредственно из реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения из одного или нескольких добавленных реагентов, который может быть получен в реакционной смеси. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт включает, например, обеспечение взаимодействия рибонуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, с эндонуклеазой и энхансерным элементом.

[0217] "Контрольный" образец или значение относится к образцу, который выступает эталоном, обычно известным эталоном, для сравнения с испытуемым образцом. Например, испытуемый образец можно отбирать из испытуемого состояния, например, в присутствии испытуемого соединения и сравнивать с образцами из известных состояний, например, при отсутствии испытуемого соединения (отрицательный контроль) или в присутствии известного соединения (положительный контроль). Контроль также может представлять собой среднее значение, полученное из некоторого количества испытаний или результатов. Специалист в данной области поймет, что контроли можно моделировать для оценки какого-либо количества параметров. Например, может быть разработан контроль для сравнения терапевтической пользы на основе фармакологических данных (например, периода полувыведения) или терапевтических критериев (например, сравнения побочных эффектов). Специалист в данной области поймет, какие стандартные контроли наиболее подходят в конкретной ситуации, и сможет проанализировать данные на основе сравнений со стандартными контрольными значениями. Стандартные контроли также важны для определения значимости (например, статистической значимости) данных. Например, если значения конкретного параметра широко разнятся в стандартных контролях, вариация в испытуемых образцах не будет рассматриваться как значимая.

[0218] Определенный в настоящем документе термин "подавление", "подавлять", "обеспечивать подавление" или т. п. означает обеспечивать отрицательное влияние (например, уменьшение) в отношении активности или функции биомолекулы или биологической системы относительно активности или функции при отсутствии ингибитора. В некоторых вариантах осуществления подавление относится к снижению в отношении заболевания или симптомов заболевания.

[0219] Определенный в настоящем документе термин "активация", "активировать", "обеспечивать активацию" или т. п. по отношению к взаимодействию активатора (например, агониста) означает обеспечивать положительное влияние (например, увеличение) на активность или функцию биомолекулы или биологической системы

относительно активности или функции при отсутствии активатора.

[0220] Применяемый в настоящем документе термин "введение" означает пероральное введение, введение в виде суппозитория, местное введение в контракт, внутривенное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриочаговое, интратекальное, внутричерепное, интраназальное или подкожное введение или имплантирование прибора, обеспечивающего замедленное высвобождение, например осмотического миниасоса, субъекту. Введение осуществляют любым путем, в том числе парентеральным и трансмукозальным (например, буккальным, подъязычным, небным, десенным, назальным, вагинальным, ректальным или трансдермальным). В некоторых вариантах осуществления введение включает непосредственное введение в опухоль. Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрижелудочковое и внутричерепное. Другие типы доставки включают без ограничения применение липосомальных составов, внутривенной инфузии, трансдермальных пластырей и т. д. Под "совместным введением" имеется в виду, что композицию, описанную в настоящем документе, вводят в то же самое время, прямо перед или прямо после введения одного или нескольких дополнительных средств терапии (например, противоракового средства или химиотерапевтического средства). Композицию по настоящему изобретению пациенту можно вводить отдельно или можно вводить совместно. Совместное введение включает одновременное или последовательное введение соединения отдельно или в комбинации (более чем одно соединение или средство). Поэтому препараты также могут быть комбинированы, при необходимости, с другими активными веществами (например для снижения метаболического разрушения). Композиции, описанные в настоящем документе, также можно доставлять трансдермально, местным путем, составлять в виде аппликаторов, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желатиновых препаратов, красок, порошков и аэрозолей. Пероральные препараты включают таблетки, пилюли, порошки, драже, капсулы, жидкости, пастилки, саше, гели, сиропы, взвеси, суспензии и т. д., подходящие для проглатывания пациентом. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, растворы в воде или смеси вода/пропиленгликоль. Композиции, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать компоненты для обеспечения отсроченного высвобождения и/или удобства. Такие компоненты включают высокомолекулярные, анионные полимеры-мукомиметики, гелеобразующие полисахариды и мелкодисперсные субстраты-носители для лекарственного средства. Эти компоненты очень подробно описаны в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162 и 4861760. Полное содержание этих патентов включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Композиции, описанные в настоящем документе, также можно доставлять в виде микросфер для замедленного высвобождения в организме. Например, микросферы можно вводить путем внутрикожной инъекции

микросфер, содержащих лекарственное средство, которые обеспечивают замедленное подкожное высвобождение (см. Rao, J. *Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995;), в виде биоразлагаемых и вводимых желеобразных составов (см., например, Gao *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995); или в виде микросфер для перорального введения (см., например, Eyles, J. *Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997). В другом варианте осуществления составы композиций, описанных в настоящем документе, можно доставлять путем применения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной или подвергаются эндоцитозу, т. е. путем использования присоединенных к липосоме лигандов рецепторов, которые связываются с белковыми рецепторами на поверхности мембраны клетки, что приводит к эндоцитозу. Путем применения липосом, в частности когда поверхность липосом несет лиганды рецепторов, специфичные для целевых клеток или другим образом избирательно направляются на конкретный орган, специалист может направить доставку композиций, описанных в настоящем документе, в целевые клетки *in vivo*. (См., например, Al-Muhammed, J. *Microencapsul.* 13:293-306, 1996; Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995; Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989). Композиции, описанные в настоящем документе, также можно доставлять в виде наночастиц.

[0221] Дозу и частоту (одной или нескольких доз) введения млекопитающему можно изменять исходя из ряда разных факторов, например того, страдает ли млекопитающее от другого заболевания, и пути введения; размера, возраста, пола, состояния здоровья, массы тела, индекса массы тела и режима питания реципиента; природы и степени выраженности симптомов заболевания, подвергаемого лечению (например, симптомов рака (например, рака предстательной железы, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, рака легкого, плоскоклеточной карциномы (например, головы, шеи или пищевода), колоректального рака, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, В-клеточной лимфомы или множественной миеломы)), типа сопутствующего лечения, осложнений от заболевания, подвергаемого лечению, или других связанных со здоровьем проблем. Другие терапевтические режимы или средства можно применять вместе со способами и соединениями по настоящему изобретению. Регулирование и преобразование установленных доз (например, частоты и продолжительности) находятся в пределах возможностей специалистов в данной области.

[0222] Для соединений или композиций, описанных в настоящем документе, терапевтически эффективное количество может быть изначально определено на основе анализов культур клеток. Целевые концентрации будут представлять собой такие концентрации активного(-ых) соединения(-й), которые способны обеспечивать способы, описанные в настоящем документе, как измерено с применением способов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники.

[0223] Как хорошо известно в уровне техники, терапевтически эффективные количества для применения в организмах людей можно также определять на основе животных моделей. Например, для людей доза может быть составлена с достижением

концентрации, которая, как было выяснено, является эффективной для животных. Дозу для людей можно регулировать путем наблюдения за эффективностью соединений и регулирования дозы в большую или меньшую сторону, как описано выше. Регулирование дозы с достижением максимальной эффективности для людей на основе описанных выше способов и других способов находится в пределах компетенции специалиста средней квалификации в данной области.

[0224] Дозы можно изменять исходя из требований для пациента и используемого соединения. Доза, вводимая пациенту, должна быть достаточной для обеспечения благоприятного терапевтического ответа у пациента через определенное время. Размер дозы также будет определяться на основе существования, природы и степени проявления каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Определение надлежащей дозы для конкретной ситуации находится в пределах умений практикующего врача. В общем лечение начинают с меньших доз, которые составляют менее чем оптимальную дозу соединения. Впоследствии дозу увеличивают небольшими шагами до достижения оптимального эффекта в конкретных обстоятельствах.

[0225] Количество доз и интервалы можно регулировать индивидуально с получением уровней введенного соединения, эффективного для лечения конкретного клинического показателя. Это обеспечит терапевтический режим, который соответствует тяжести состояния заболевания индивидуума.

[0226] Применяя предусмотренные в настоящем документе руководства, можно составить план эффективного профилактического или терапевтического режима лечения, который не обуславливает существенную токсичность и все еще является эффективным для лечения клинических симптомов, проявляемых у конкретного пациента. Такое составление плана должно предусматривать внимательный выбор активного соединения путем рассмотрения таких факторов, как сила соединения, относительная биодоступность, вес тела пациента, наличие и тяжесть неблагоприятных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного средства.

[0227] Применяемый в настоящем документе термин "приблизительно" означает диапазон значений, включающий указанное значение, которое специалист средней квалификации в данной области посчитает приемлемо похожим на указанное значение. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" означает в пределах стандартного отклонения с применением измерений, в общем приемлемых в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления приблизительно означает диапазон, протягивающийся на +/- 10% от указанного значения. В некоторых вариантах осуществления приблизительно означает указанное значение.

[0228] Как описано в настоящем документе, объективная техническая проблема, подлежащая решению в свете предыдущего уровня техники, представляет собой обеспечение улучшенных композиций и способов для предупреждения и лечения заболеваний и состояний, при которых экспрессируется лиганд NKG2D (NKG2D-L+). В некоторых вариантах осуществления такие заболевания и состояния, при которых

экспрессируется лиганд NKG2D, включают рак и аутоиммунные заболевания. В настоящем документе впервые представлено решение этой проблемы. Усечение рекомбинантных белков представляет собой основную проблему в культурах клеток. Белки, полученные в бактериальных и млекопитающих клетках-хозяевах с помощью технологии рекомбинантной ДНК, часто полностью или частично разрушаются в культуре. Это является основной трудностью в индустрии биотехнологий, где часто необходимы эффективность и высокая продуктивность при низкой стоимости. Следовательно, снижение риска усечения или минимизация уровня усечения являются чрезвычайно важными для терапевтических средств на основе рекомбинантных белков. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, демонстрировали неожиданную, замечательную и более высокую стабильность (например, меньшее усечение) внутри клеток (см., например, **фиг. 5А-5С**) по сравнению с конструкцией(-ями) из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления комбинация композиций, описанных в настоящем документе, и применения модифицированной клеточной линии CHO (например, клеток CHO, содержащих инактивированный или нокаутированный ген матриптазы (CHO-Mako)), обеспечивает уменьшение риска усечения до минимального уровня. Кроме того, композиции, описанные в настоящем документе, продемонстрировали превосходные терапевтические эффекты *in vitro* и *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, продемонстрировали замечательный эффект в отношении улучшения активности ADCC (см., например, **фиг. 9А-9Е**). В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, продемонстрировали замечательную специфичность связывания со всеми лигандами NKG2D с одноразрядным наномолярным значением EC50 (см., например, **фиг. 11А-11В, фиг. 12А-12В**). В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, продемонстрировали превосходную эффективность *in vivo* в отношении уничтожения NKG2D-L+ опухолей (см., например, **фиг. 18, 24А-24В**). Равнозначно важно, что была продемонстрирована замечательная способность к разработке композиций, описанных в настоящем документе, с низким риском и средними техническими затратами на основе оценки способности к их разработке.

[0229] Композиции

[0230] Соответственно, в настоящем документе представлен димерный белок, который включает два мономера, где каждый мономер включает (1) первый пептид NKG2D или его вариант; (2) второй пептид NKG2D или его вариант; (3) первый пептидный линкер, соединяющий указанный первый пептид NKG2D или его вариант и указанный второй пептид NKG2D или его вариант; и (4) область, представляющую собой кристаллизующийся фрагмент (Fc-область) иммуноглобулина (Ig).

[0231] В некоторых вариантах осуществления два мономера характеризуются идентичными аминокислотными последовательностями.

[0232] В некоторых вариантах осуществления два мономера характеризуются

различными аминокислотными последовательностями.

[0233] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант и второй пептид NKG2D или его вариант характеризуются идентичной аминокислотной последовательностью.

[0234] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант и второй пептид NKG2D или его вариант характеризуются различными аминокислотными последовательностями.

[0235] В некоторых вариантах осуществления каждый пептид NKG2D или его вариант димерного белка содержит внеклеточную часть последовательности NKG2D, например аминокислотные остатки 78-216 NKG2D человека; 78-232, 94-232 или 92-232 NKG2D мыши. В некоторых вариантах осуществления димерный белок содержит часть внеклеточного домена NKG2D. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен NKG2D димерного белка может быть укорочен на N-конце, на C-конце или на обоих концах. В некоторых вариантах осуществления N-конец внеклеточного домена, используемого для получения димерного белка, может быть укорочен на один или несколько аминокислотных остатков, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, на приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60 и т. д., относительно полноразмерной внеклеточной части полипептида. В некоторых вариантах осуществления C-конец внеклеточного домена, используемого для получения димерного белка, может быть укорочен на один или несколько аминокислотных остатков, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, на приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60 и т. д., относительно полноразмерной внеклеточной части полипептида. На примере NKG2D человека димерный белок может содержать фрагмент внеклеточного домена NKG2D человека, где N-конец домена начинается с аминокислотного остатка 79, 80, 81, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140 или приблизительно 150. В некоторых вариантах осуществления димерный белок может содержать фрагмент внеклеточного домена NKG2D, где C-конец домена заканчивается аминокислотным остатком 231, 230, 229, 228, 227, 226, 225, 224, 223, 222, 221, 220, 219, 218, 217, 216, 215, 214, 213, 212, 211, 210, 209, 208, 207, 206, 205 и так далее. Такие делеции на каждом конце внеклеточного домена последовательности NKG2D можно комбинировать.

[0236] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из, содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0237] В некоторых вариантах осуществления первый пептид NKG2D или его

(например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0247] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 1.

[0248] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 2.

[0249] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 3.

[0250] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 4.

[0251] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0252] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1.

[0253] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

[0254] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3.

[0255] В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4.

[0256] В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область иммуноглобулина G (IgG) человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG1 человека. В некоторых вариантах

осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG3 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgG2a мыши. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgM человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgA1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgA2 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgD человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область предусматривает Fc-область IgE человека.

[0257] Fc-область иммуноглобулинов играет важную роль в опосредовании иммунной защиты. FcγR экспрессируются в значительной степени в виде трансмембранных гликопротеинов на ряде типов клеток, в том числе макрофагах, NK-клетках, дендритных клетках, В-клетках, нейтрофилах и тучных клетках. Fc-опосредованные типы активности включают рекрутирование эффекторных клеток посредством взаимодействий Fc-FcγR. Существует два класса Fc-рецепторов, которые можно различать функционально: класс активирующих Fc-рецепторов и класс ингибирующих Fc-рецепторов. Активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA человека, а также их мышинные ортологи, т. е. FcγRI, FcγRIII, FcγRIV. Активирующие FcγR опосредуют ADCC и ADCP, индуцируют эндоцитоз иммунных комплексов, что приводит к презентации антигена, и способствуют выработке и высвобождению цитокинов и провоспалительных факторов. Общий обзор структуры и механизмов действия IgG см. в Liu et al. (2008; *Immunological Reviews*, 222: 9-27). В некоторых вариантах осуществления Fc-часть димерного белка, описанного в настоящем документе, представляет собой домен, который связывает активирующий Fc-рецептор, а в некоторых вариантах осуществления представляет собой активирующий домен Fc Ig и включает шарнирную область, обеспечивающую димеризацию.

[0258] Fc-часть димерного белка, применимого по данному раскрытию, может быть легко адаптирована для обеспечения его видоспецифичности. В некоторых вариантах осуществления для применения в мышинной системе, например в клетках, полученных от мыши, Fc-фрагмент, используемый для получения димерного белка, имеет мышинное происхождение. В некоторых вариантах осуществления применяют Fc-фрагмент IgG2a мыши. В некоторых вариантах осуществления для применения у субъекта-человека Fc-фрагмент, используемый для получения димерного белка, имеет человеческое происхождение. В некоторых вариантах осуществления каждый мономер димерного белка содержит активирующий домен Fc Ig. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит область, представляющую собой кристаллизующийся фрагмент (Fc) иммуноглобулина (IgG) человека. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин человека представляет собой IgG1.

[0259] В некоторых вариантах осуществления в описанном в настоящем документе

димерном белке используют мутант или аллотип Fc-фрагмента. Описан ряд полезных мутаций в домене Fc, которые могут влиять на взаимодействие Fc и его рецептора, эффекторную функцию Fc, а также время полужизни молекулы, содержащей Fc. Они включают специфические аминокислотные замены и/или модификации углеводных фрагментов в Fc. Для обзора см., например, Liu et al., 2008, *Immunological Reviews*, 222:9-27; Nimmerjahn & Ravetch, 2007, *Curr. Opin. Immunol.*, 19(2): 239-45. В некоторых вариантах осуществления мутантный Fc, используемый в настоящем документе, проявляет более высокую аффинность к FcγRIIIA, но не к FcγRIIB, тем самым стимулируя ADCC. В некоторых вариантах осуществления мутантный Fc, используемый в настоящем документе, проявляет более высокую аффинность к FcγRIIIA и пониженное связывание с FcγRIIB. В некоторых вариантах осуществления мутантный Fc, используемый в настоящем документе, включает мутации Ser298Ala/Glu333Ala/Lys334Ala. В некоторых вариантах осуществления мутантный Fc, используемый в настоящем документе, включает мутации Ser239Asp/Ile332Glu, которые, как ожидается, вызывают улучшение ADCC. Другие мутации для усиления ADCC включают, без ограничения Ser239Asp/Ala330Leu/Ile332Glu, Ser239Asp/Ser298Ala/Ile332Ala и Phe243Leu/Arg292Pro/Tyr300Leu/Val305Ile/Pro396Leu. В некоторых вариантах осуществления мутантный Fc, используемый в настоящем документе, представляет собой "молчащий Fc", т. е. имеет минимальное взаимодействие с эффекторными клетками. Подавленные эффекторные функции могут быть получены посредством мутации в Fc-области антител и были описаны в уровне техники: LALA и N297A (Strohl, W., 2009, *Curr. Opin. Biotechnol.* vol. 20(6):685-691); а также D265A (Baudino et al., 2008, *J. Immunol.* 181: 6664- 69), см. также Heusser et al., WO2012065950. Примеры мутаций сайленсинга Fc включают мутант LALA, содержащий мутации L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1, DAPA (D265A, P329A) (см., например, US 6737056), N297A, DANAPA (D265A, N297A и P329A) и/или LALADANAPS (L234A, L235A, D265A, N297A и P331S).

[0260] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.

[0261] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 5.

[0262] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 6.

[0263] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 63.

[0264] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 64.

[0265] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 65.

[0266] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 68.

[0267] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.

[0268] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5.

[0269] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 6.

[0270] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 63.

[0271] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 64.

[0272] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 65.

[0273] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит или, в качестве альтернативы, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 68.

[0274] В некоторых вариантах осуществления один или оба из двух мономеров включают от N-конца к C-концу первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер, второй пептид NKG2D или его вариант и Fc-область. В некоторых

вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант сливают непосредственно с Fc-областью без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант связывают с Fc-областью посредством второго пептидного линкера.

[0275] В некоторых вариантах осуществления димер включает два идентичных мономера, где каждый мономер включает от N-конца к С-концу первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер, второй пептид NKG2D или его вариант и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант сливают непосредственно с Fc-областью без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления второй пептид NKG2D или его вариант связывают с Fc-областью посредством второго пептидного линкера.

[0276] В некоторых вариантах осуществления один или оба из двух мономеров включают от N-конца к С-концу Fc-область, первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер и второй пептид NKG2D или вариантную область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область слита непосредственно с первым пептидом NKG2D или его вариантом без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с первым пептидом NKG2D или его вариантом посредством второго пептидного линкера.

[0277] В некоторых вариантах осуществления димер включает два идентичных мономера, где каждый мономер включает, где каждый мономер включает от N-конца к С-концу Fc-область, первый пептид NKG2D или его вариант, первый пептидный линкер и второй пептид NKG2D или его вариантную область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область слита непосредственно с первым пептидом NKG2D или его вариантом без пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с первым пептидом NKG2D или его вариантом посредством второго пептидного линкера.

[0278] В некоторых вариантах осуществления один или оба из двух мономеров дополнительно содержат один или два дополнительных пептида NKG2D или их варианты.

[0279] В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или двух дополнительных пептидов NKG2D или их вариантов содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0280] В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или двух дополнительных пептидов NKG2D или их вариантов содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

[0281] В некоторых вариантах осуществления используемый в настоящем документе линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах

осуществления линкер представляет собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) составляет приблизительно 20 или менее (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит приблизительно 12 или менее аминокислотных остатков, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) составляет приблизительно 20 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) составляет в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 16 (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) составляет более 25 аминокислот в длину.

[0282] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер или второй пептидный линкер) содержит две или более из следующих аминокислот: глицин, серин, аланин и пролин. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер представлен формулой $(GS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $G4S$, представленный формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $G4A$, представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $G4P$, представленный формулой $(GGGP)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $G3A$, представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представлен формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $GGSGGS$ (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $GGGS$ (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления глицин-сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $GGGS$ (SEQ ID NO: 66).

[0283] В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет приблизительно 20 или менее аминокислот в длину. В некоторых вариантах

осуществления первый пептидный линкер содержит приблизительно 12 или менее аминокислотных остатков, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет 20 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 16 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер составляет более 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер содержит две или более из следующих аминокислот: глицин, серин, аланин и пролин. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представлен формулой $(GS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой линкер G_4S , представленный формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой линкер G_4A , представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой линкер G_4P , представленный формулой $(GGGP)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представляет собой линкер G_3A , представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер представлен формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $GGSGGS$ (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $GGGS$ (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления первый пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $GGGS$ (SEQ ID NO: 66).

[0284] В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер составляет приблизительно 20 или менее аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер содержит приблизительно 12 или менее аминокислотных остатков, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер составляет 20 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер составляет в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 16 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах

осуществления второй пептидный линкер составляет в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер составляет более 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер содержит две или более из следующих аминокислот: глицин, серин, аланин и пролин. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представлен формулой $(GS)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представляет собой линкер G4S, представленный формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представляет собой линкер G4A, представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представляет собой линкер G4P, представленный формулой $(GGGP)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представляет собой линкер G3A, представленный формулой $(GGGA)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер представлен формулой $(GGGS)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGS (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления второй пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 66).

[0285] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер (например, первый пептидный линкер и/или второй пептидный линкер) включает протеазозависимый сайт расщепления. Примеры расщепляемых протеазами пептидных линкеров включают без ограничения линкер, чувствительный в отношении MMP, GGPLGL W AGG (SEQ ID NO: 15), и линкер, чувствительный в отношении фактора Ха, IEGR (SEQ ID NO: 16). Специалисту в данной области должно быть понятно, что для линкера, предусмотренного в настоящем документе, можно использовать множество расщепляемых последовательностей.

[0286] В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула или линкер могут представлять собой непептидный линкер. Непептидный линкер в контексте данного документа представляет собой биосовместимый полимер, включающий две или более повторяющихся единиц, связанных друг с другом. Примеры непептидного полимера включают без ограничения полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG), сополимер (этилен/пропилен)гликоль, полиоксиэтилен (POE), полиуретан, полифосфазен, полисахариды, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидоны, поливинилэтиловый эфир, полиакриламид, полиакрилат, полицианоакрилаты, липидные

полимеры, хитины, гиалуроновую кислоту и гепарин. Более подробное описание непептидных линкеров, применимых для слитых молекул на основе Fc, см., например, в WO/2006/107124, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такие линкеры будут характеризоваться молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 1 кДа до 50 кДа в зависимости от конкретного линкера. В некоторых вариантах осуществления типичный PEG характеризуется молекулярной массой от приблизительно 1 до 5 кДа, а полиэтиленгликоль характеризуется молекулярной массой от приблизительно 5 кДа до 50 кДа и более предпочтительно от приблизительно 10 кДа до 40 кДа.

[0287] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, или 69.

[0288] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 17.

[0289] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 19.

[0290] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 21.

[0291] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 23.

[0292] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 25.

[0293] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 27.

[0294] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности,

характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 49.

[0305] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 51.

[0306] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 53.

[0307] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 55.

[0308] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 57.

[0309] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 59.

[0310] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 61.

[0311] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 69.

[0312] В некоторых вариантах осуществления димер включает два мономера, где каждый мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, или 69.

[0313] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, или 69.:

альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 43.

[0328] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 45.

[0329] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 47.

[0330] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 49.

[0331] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 51.

[0332] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 53.

[0333] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 55.

[0334] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57.

[0335] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 59.

[0336] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 61.

[0337] В некоторых вариантах осуществления мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 69.

[0338] В некоторых вариантах осуществления димер включает два мономера, где каждый мономер содержит или, в качестве альтернативы, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, или 69.

[0339] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99%, 100%) идентичности с SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, или 70.

[0340] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 18.

[0341] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 20.

[0342] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 22.

[0343] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 24.

[0344] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 26.

[0345] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 28.

[0346] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 30.

[0347] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85%

(например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичностью с SEQ ID NO: 70.

[0364] В некоторых вариантах осуществления димер включает два мономера, где каждый мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) идентичности с SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, или 70.

[0365] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, или 70.

[0366] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 18.

[0367] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 20.

[0368] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 22.

[0369] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 24.

[0370] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 26.

[0371] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 28.

[0372] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 30.

[0373] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 32.

[0374] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 34.

[0375] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO:

[0389] В некоторых вариантах осуществления мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 70.

[0390] В некоторых вариантах осуществления димер включает два мономера, где каждый мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, или 70.

[0391] В некоторых вариантах осуществления два мономера ковалентно связаны. Например, конъюгат между первой реакционноспособной группой биоконъюгата (например, -NH₂, -COOH, -N-гидроксисукцинимид или -малеимид) мономера и второй реакционноспособной группой биоконъюгата (например, сульфгидрильной, серосодержащей аминокислотой, амином, аминокислотой, содержащей аминную боковую цепь, или карбоксилатом) другого мономера, представленного в настоящем документе, может быть прямым, например посредством ковалентной связи или линкера. В некоторых вариантах осуществления мономеры связаны посредством мостика Cys-Cys.

[0392] В некоторых вариантах осуществления димерный белок дополнительно содержит фрагмент, представляющий собой лекарственное средство.

[0393] Используемый в настоящем документе термин "фрагмент лекарственного средства" относится к терапевтическому средству, которое предназначено для доставки в целевую клетку (например, раковую клетку). Как правило, компонент лекарственного средства конъюгирован (например, прямо или опосредованно ковалентно связан) с карбокси-концом мономера димерного белка, описанного в настоящем документе. Однако специалисту в данной области известно, что в некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства конъюгирован с амино-концом мономера димерного белка, описанного в настоящем документе. Примеры "фрагментов лекарственных средств" включают лекарственные средства (например, малые молекулы), токсины (например, молекулы семейства лимфотоксинов), радионуклиды, ферменты, цитокины, хемокины, одноцепочечные переменные фрагменты антител, направленные против активирующих соединений или блокирующие ангиогенез, или по сути любое противоопухолевое соединение. В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства непосредственно слит с амино-концом и/или карбокси-концом мономера димерного белка, описанного в настоящем документе.

[0394] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства содержит цитокин или его функциональную часть. Цитокины представляют собой белки и пептиды, способные модулировать функцию иммунных клеток. "Функциональная часть" цитокина представляет собой фрагмент цитокина, который сохраняет способность модулировать функцию иммунных клеток (например, связываться с одним или несколькими рецепторами цитокинов). Примеры цитокинов включают без ограничения трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), интерферон-альфа (IFN-α), интерферон-бета (IFN-β) и интерферон-гамма (IFN-γ), интерлейкины (например, от IL-1 до IL-36, в

частности IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 и IL-18), факторы некроза опухоли (например, TNF-альфа и TNF-бета), эритропоэтин (EPO), MIP3a, моноцитарный хемотаксический белок (MCP)-1, молекулу внутриклеточной адгезии (ICAM), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из: TGF β , IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IFN- α .

[0395] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства содержит гетерокомплекс цитокин/цитокиновый рецептор. Гетерокомплексы цитокин/цитокиновый рецептор известны в уровне техники и описаны, например, в Rowley et al., Eur J Immunol. 2009 Feb; 39(2): 491-506. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, включает компонент лекарственного средства, содержащий гетерокомплекс IL-15 (например, GenBank AAX37025)/IL-15Ra (например, GenBank AAP69528.1). В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства содержит аминокислоты 31-107 рецептора IL-15 альфа человека (hIL15Ra, GenBank AAP69528.1), слитые с аминокислотами 22-135 IL-15 (GenBank AAX37025). В некоторых вариантах осуществления IL-15 и IL-15Ra разделены линкером, например, 20-аминокислотным (G4S)₄ (SEQ ID NO: 3) линкером. Димерная химера NKG2D-Fc, содержащая гетерокомплекс IL-15/IL-15Ra, дополнительно описана в разделе "Примеры". В некоторых вариантах осуществления димерная химера NKG2D-Fc включает компонент лекарственного средства, содержащий гетерокомплекс IL-12p35 и IL-12p40. В некоторых вариантах осуществления IL-12p35 и IL-12p40 разделены посредством описанного в настоящем документе пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, включает компонент лекарственного средства, содержащий гетерокомплекс IL-23p19 и IL-23p40. В некоторых вариантах осуществления IL-23p19 и IL-23p40 разделены посредством описанного в настоящем документе пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, включает компонент лекарственного средства, содержащий гетерокомплекс IL-27p28 и EB 1. В некоторых вариантах осуществления IL-27p28 и EB 1 разделены посредством описанного в настоящем документе пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления каждая субъединица гетерокомплекса цитокин/цитокиновый рецептор находится на другом мономере димерного белка, описанного в настоящем документе.

[0396] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент антитела (ScFv). Используемый в настоящем документе термин "одноцепочечный переменный фрагмент антитела" относится к слитому белку переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов, соединенному посредством короткого линкерного пептида.

Белки ScFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. В некоторых вариантах осуществления ScFv связывается с белком иммунной контрольной точки (например, PD1 или CTLA4). В некоторых вариантах осуществления ScFv блокирует ангиогенез (например, связывается с регулятором ангиогенеза, например VEGF).

[0397] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства представляет собой хемокин. Используемый в настоящем документе термин "хемокины" относится к низкомолекулярным белкам, которые стимулируют рекрутирование лейкоцитов. Как правило, хемокины являются вторичными провоспалительными медиаторами, которые индуцируются первичными провоспалительными медиаторами, такими как интерлейкин-1 (IL-1) или фактор некроза опухоли (TNF). Хемокины можно разделить на четыре семейства: хемокины CC (например, от CCL1 до CCL-28), CXC (например, от CXCL1 до CXCL17), C (например, XCL1, XCL2) и CX3C (CX3CL1).

[0398] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства представляет собой малую молекулу. Используемый в настоящем документе термин "малая молекула" относится к непептидному, неолигомерному органическому соединению, либо синтезированному в лаборатории, либо обнаруженному в природе. Неограничивающие примеры лекарственных средств на основе малых молекул включают низкомолекулярные ингибиторы киназы (например, эверолимус, гефитиниб, иматиниб и т. д.), ингибиторы бромодомена (например, JQ1, 1-BET 151, RVX-208 и т. д.), антибиотики (например, канамицин, неомицин, ципрофлоксацин и др.) и противовирусные препараты (например, рибавирин, римантадин, зидовудин и др.). В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой противоопухолевое соединение. Противоопухолевые соединения обсуждаются более подробно в другом месте настоящего описания.

[0399] В некоторых вариантах осуществления компонент лекарственного средства представляет собой радионуклид. Используемый в настоящем документе термин "радионуклид" относится к применимым в медицине радионуклидам. Примеры радионуклидов включают: ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^mIn , ^{183}Gd , ^{59}Fe , ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , и ^{67}Cu .

[0400] Также в настоящем документе предусмотрен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, или 70.

[0401] Кроме того, в настоящем документе предусмотрен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе.

[0402] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные векторы, используемые в настоящем документе, включают без ограничения векторы, раскрытые в EP3027646 B1 или WO2009/080720, содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0403] Кроме того, в настоящем документе предусмотрена композиция, содержащая димерный белок, описанный в настоящем документе, выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, или вектор, описанный в настоящем документе.

[0404] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" и "фармацевтически приемлемый носитель" относятся к веществу, которое способствует введению активного средства и абсорбции субъектом, и может быть включено в композиции по настоящему изобретению, не оказывая значительного неблагоприятного токсикологического воздействия на пациента. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ включают воду, NaCl, нормальные солевые растворы, раствор Рингера с добавлением лактата, нормальную сахарозу, нормальную глюкозу, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, покрытия, подсластители, ароматизаторы, растворы солей (такие как раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидин и красители и т. п. Такие препараты можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными средствами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, смачивающие средства, эмульгаторы, соли для воздействия на осмотическое давление, буферы, красители и/или ароматические вещества и т. п., которые не оказывают пагубного воздействия на соединения по настоящему раскрытию. Специалисту в данной области будет понятно, что в настоящем раскрытии можно использовать и другие фармацевтические вспомогательные вещества.

[0405] Также в настоящем документе предусмотрена клетка, содержащая димерный белок, описанный в настоящем документе, выделенный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, вектор, описанный в настоящем документе, или композицию, описанную в настоящем документе.

[0406] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).

[0407] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой модифицированную клетку СНО.

[0408] В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка СНО содержит инактивированный ген матриптазы или характеризуется нокаутом (делецией) гена матриптазы. В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки СНО содержат клетки, описанные в WO2015166427, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Подходящие способы селекции для продуцирующих клеточных линий раскрыты в WO 2010/022961 и WO 2015/015419, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0409] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в

настоящем документе, продуцируемый модифицированной клеткой СНО, является более активным, чем белок, продуцируемый другими типами клеточных линий (например, клетками НЕК) (см., например, фиг. 9). В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе димерный белок, продуцируемый модифицированной клеткой СНО, по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более эффективен, чем димерный белок, продуцируемый другими типами клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления активность димерного белка, описанного в настоящем документе, можно измерить по его ADCC-активности любым способом, известным в уровне техники. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, продуцируемый модифицированной клеткой СНО, имеет ADCC-активность, которая по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более выше, чем ADCC-активность димерного белка, продуцируемого другими типами клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления активность димерного белка можно измерить с помощью кинетических констант аффинности связывания (K_D) в соответствии с любым способом, известным в уровне техники. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, продуцируемый модифицированной клеткой СНО, имеет K_D для лиганда NKG2D, которая по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10 раз или ниже (т. е. сильнее), чем K_D димерного белка, продуцируемого другими типами клеточных линий.

[0410] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, продуцируемый модифицированной клеткой СНО, имеет гораздо лучшие фармакокинетические (ПК) свойства *in vivo*, чем фармакокинетические свойства такового, продуцируемого другими типами клеточных линий (например, клетками НЕК) (см., например, **фиг. 20**). В некоторых вариантах осуществления фармакокинетические свойства включают без ограничения объем распределения (V_D), пиковую концентрацию лекарственного средства в плазме крови после введения (C_{max}), время достижения C_{max} (t_{max}), объем плазмы, очищенной от лекарственного средства в единицу времени (CL), интеграл кривой зависимости концентрации от времени (после однократного приема или в равновесном состоянии) (площадь под кривой, AUC), время, необходимое для того, чтобы концентрация лекарственного средства достигла половины своего исходного значения ($t_{1/2}$).

[0411] В некоторых вариантах осуществления ПК-значение *in vivo* описанного в настоящем документе димерного белка, продуцируемого модифицированной клеткой СНО, по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% лучше, чем РК-значение димерного белка, продуцируемого другими типами клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления значение РК можно определить на основании V_D , $t_{1/2}$ и/или AUC, рассчитанных в соответствии со способами, известными в уровне техники.

[0412] В настоящем документе предусмотрен димерный белок, продуцируемый клеткой, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, или димерный белок, продуцируемый клеткой, описанной в настоящем документе, является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления Fc-область димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, является гликозилированной. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, или димерный белок, продуцируемый клеткой, описанной в настоящем документе, является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления Fc-область димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, является афукозилированной.

[0413] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, или димерный белок, продуцируемый клеткой, описанной в настоящем документе, включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 сайтов гликозилирования.

[0414] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, или димерный белок, продуцируемый клеткой, описанной в настоящем документе, включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 сайтов фукозилирования.

[0415] В некоторых вариантах осуществления уровень гликозилирования каждого мономера димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, составляет по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%.

[0416] В некоторых вариантах осуществления уровень афукозилирования каждого мономера димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, составляет по меньшей мере

5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%.

[0417] В некоторых вариантах осуществления уровень гликозилирования каждой Fc-области димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, составляет по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%.

[0418] В некоторых вариантах осуществления уровень афукозилирования каждой Fc-области димерного белка, описанного в настоящем документе, или димерного белка, продуцируемого клеткой, описанной в настоящем документе, составляет по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%.

[0419] В вариантах осуществления гликозилированный димерный белок, описанный в настоящем документе, имеет более высокую (например, по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10 раз большую) аффинность связывания с лигандом NKG2D по сравнению с менее гликозилированным или негликозилированным димерным белком, описанным в настоящем документе.

[0420] В некоторых вариантах осуществления гликозилированный димерный белок, описанный в настоящем документе, имеет более высокую (например, по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10 раз или более) ADCC-активность по сравнению с описанным в настоящем

документе менее гликозилированным или негликозилированным димерным белком.

[0421] В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе димерный белок с более высоким уровнем афукозилирования имеет более высокую (например, по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 раз или более) аффинность связывания с Fc-рецептором (например, CD16) по сравнению с описанным в настоящем документе димерным белком с более низким уровнем афукозилирования.

[0422] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, с более высоким уровнем афукозилирования имеет более высокую (например, по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10 раз или более) ADCC-активность по сравнению с описанным в настоящем документе димерным белком с более низким уровнем афукозилирования.

[0423] Уровень гликозилирования или уровень афукозилирования можно определить любым способом, известным в уровне техники, например с помощью LC-MS или 2AB-NILIC (N-гликаны, меченные 2-аминобензамидом (2-AB)). Кроме того, в уровне техники известны способы получения белков с различными уровнями афукозилирования. Например, белки могут продуцироваться в клетке, в которой либо отсутствует фермент фукозилирования, либо за счет включения RMD, который нарушает фукозилирование.

[0424] В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе димерный белок имеет уровень клиппинга ниже приблизительно 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе димерный белок имеет уровень клиппинга ниже приблизительно 5%, 4%, 3%, 2% или 1%.

[0425] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, имеет уровень клиппинга, который на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ниже, чем уровень клиппинга димерной конструкции из предшествующего уровня техники.

[0426] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, продуцируемый в

модифицированной клетке СНО, как описано в настоящем документе, имеет уровень клиппинга, который на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ниже, чем уровень клиппинга димерного белка, продуцируемого в клетках другого типа.

[0427] Уровень клиппинга можно определить при помощи любого способа, известного в уровне техники, например способов, описанных в примере 4.

[0428] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном раскрытии, димерный белок, описанный в настоящем документе, способен связывать эндогенный лиганд рецептора NKG2D. Известные NKG2D-лиганды у человека включают MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 и ULBP6. В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, способен связывать более одного (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) типа лиганда рецептора NKG2D.

[0429] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, связывается со всеми восемью лигандами с одноразрядным наномолярным значением EC50 (см., например, **фиг. 11**). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (K_D) димерной молекулы в отношении ее лигандов составляет от $10E-06$ М до $10E-12$ М. В некоторых вариантах осуществления K_D описанной в настоящем документе димерной молекулы составляет от 0,01 нМ до 50 нМ, например от 0,06 до 12,97 нМ (например, about 0,06нМ, 0,07нМ, 0,08нМ, 0,09нМ, 0,1нМ, 0,11нМ, 0,12нМ, 0,13нМ, 0,14нМ, 0,15нМ, 0,16нМ, 0,17нМ, 0,18нМ, 0,19нМ, 0,2нМ, 0,21нМ, 0,22нМ, 0,23нМ, 0,24нМ, 0,25нМ, 0,26нМ, 0,27нМ, 0,28нМ, 0,29нМ, 0,3нМ, 0,31нМ, 0,32нМ, 0,33нМ, 0,34нМ, 0,35нМ, 0,36нМ, 0,37нМ, 0,38нМ, 0,39нМ, 0,4нМ, 0,41нМ, 0,42нМ, 0,43нМ, 0,44нМ, 0,45нМ, 0,46нМ, 0,47нМ, 0,48нМ, 0,49нМ, 0,5нМ, 0,51нМ, 0,52нМ, 0,53нМ, 0,54нМ, 0,55нМ, 0,56нМ, 0,57нМ, 0,58нМ, 0,59нМ, 0,6нМ, 0,61нМ, 0,62нМ, 0,63нМ, 0,64нМ, 0,65нМ, 0,66нМ, 0,67нМ, 0,68нМ, 0,69нМ, 0,7нМ, 0,71нМ, 0,72нМ, 0,73нМ, 0,74нМ, 0,75нМ, 0,76нМ, 0,77нМ, 0,78нМ, 0,79нМ, 0,8нМ, 0,81нМ, 0,82нМ, 0,83нМ, 0,84нМ, 0,85нМ, 0,86нМ, 0,87нМ, 0,88нМ, 0,89нМ, 0,9нМ, 0,91нМ, 0,92нМ, 0,93нМ, 0,94нМ, 0,95нМ, 0,96нМ, 0,97нМ, 0,98нМ, 0,99нМ, 1нМ, 1,01нМ, 1,02нМ, 1,03нМ, 1,04нМ, 1,05нМ, 1,06нМ, 1,07нМ, 1,08нМ, 1,09нМ, 1,1нМ, 1,11нМ, 1,12нМ, 1,13нМ, 1,14нМ, 1,15нМ, 1,16нМ, 1,17нМ, 1,18нМ, 1,19нМ, 1,2нМ, 1,21нМ, 1,22нМ, 1,23нМ, 1,24нМ, 1,25нМ, 1,26нМ, 1,27нМ, 1,28нМ, 1,29нМ, 1,3нМ, 1,31нМ, 1,32нМ, 1,33нМ, 1,34нМ, 1,35нМ, 1,36нМ, 1,37нМ, 1,38нМ, 1,39нМ, 1,4нМ, 1,41нМ, 1,42нМ, 1,43нМ, 1,44нМ, 1,45нМ, 1,46нМ, 1,47нМ, 1,48нМ, 1,49нМ, 1,5нМ, 1,51нМ, 1,52нМ, 1,53нМ, 1,54нМ, 1,55нМ, 1,56нМ, 1,57нМ, 1,58нМ, 1,59нМ, 1,6нМ, 1,61нМ, 1,62нМ, 1,63нМ, 1,64нМ, 1,65нМ, 1,66нМ, 1,67нМ, 1,68нМ, 1,69нМ, 1,7нМ, 1,71нМ,

5,76nM, 5,77nM, 5,78nM, 5,79nM, 5,8nM, 5,81nM, 5,82nM, 5,83nM, 5,84nM, 5,85nM,
5,86nM, 5,87nM, 5,88nM, 5,89nM, 5,9nM, 5,91nM, 5,92nM, 5,93nM, 5,94nM, 5,95nM,
5,96nM, 5,97nM, 5,98nM, 5,99nM, 6nM, 6,01nM, 6,02nM, 6,03nM, 6,04nM, 6,05nM, 6,06nM,
6,07nM, 6,08nM, 6,09nM, 6,1nM, 6,11nM, 6,12nM, 6,13nM, 6,14nM, 6,15nM, 6,16nM,
6,17nM, 6,18nM, 6,19nM, 6,2nM, 6,21nM, 6,22nM, 6,23nM, 6,24nM, 6,25nM, 6,26nM,
6,27nM, 6,28nM, 6,29nM, 6,3nM, 6,31nM, 6,32nM, 6,33nM, 6,34nM, 6,35nM, 6,36nM,
6,37nM, 6,38nM, 6,39nM, 6,4nM, 6,41nM, 6,42nM, 6,43nM, 6,44nM, 6,45nM, 6,46nM,
6,47nM, 6,48nM, 6,49nM, 6,5nM, 6,51nM, 6,52nM, 6,53nM, 6,54nM, 6,55nM, 6,56nM,
6,57nM, 6,58nM, 6,59nM, 6,6nM, 6,61nM, 6,62nM, 6,63nM, 6,64nM, 6,65nM, 6,66nM,
6,67nM, 6,68nM, 6,69nM, 6,7nM, 6,71nM, 6,72nM, 6,73nM, 6,74nM, 6,75nM, 6,76nM,
6,77nM, 6,78nM, 6,79nM, 6,8nM, 6,81nM, 6,82nM, 6,83nM, 6,84nM, 6,85nM, 6,86nM,
6,87nM, 6,88nM, 6,89nM, 6,9nM, 6,91nM, 6,92nM, 6,93nM, 6,94nM, 6,95nM, 6,96nM,
6,97nM, 6,98nM, 6,99nM, 7nM, 7,01nM, 7,02nM, 7,03nM, 7,04nM, 7,05nM, 7,06nM, 7,07nM,
7,08nM, 7,09nM, 7,1nM, 7,11nM, 7,12nM, 7,13nM, 7,14nM, 7,15nM, 7,16nM, 7,17nM,
7,18nM, 7,19nM, 7,2nM, 7,21nM, 7,22nM, 7,23nM, 7,24nM, 7,25nM, 7,26nM, 7,27nM,
7,28nM, 7,29nM, 7,3nM, 7,31nM, 7,32nM, 7,33nM, 7,34nM, 7,35nM, 7,36nM, 7,37nM,
7,38nM, 7,39nM, 7,4nM, 7,41nM, 7,42nM, 7,43nM, 7,44nM, 7,45nM, 7,46nM, 7,47nM,
7,48nM, 7,49nM, 7,5nM, 7,51nM, 7,52nM, 7,53nM, 7,54nM, 7,55nM, 7,56nM, 7,57nM,
7,58nM, 7,59nM, 7,6nM, 7,61nM, 7,62nM, 7,63nM, 7,64nM, 7,65nM, 7,66nM, 7,67nM,
7,68nM, 7,69nM, 7,7nM, 7,71nM, 7,72nM, 7,73nM, 7,74nM, 7,75nM, 7,76nM, 7,77nM,
7,78nM, 7,79nM, 7,8nM, 7,81nM, 7,82nM, 7,83nM, 7,84nM, 7,85nM, 7,86nM, 7,87nM,
7,88nM, 7,89nM, 7,9nM, 7,91nM, 7,92nM, 7,93nM, 7,94nM, 7,95nM, 7,96nM, 7,97nM,
7,98nM, 7,99nM, 8nM, 8,01nM, 8,02nM, 8,03nM, 8,04nM, 8,05nM, 8,06nM, 8,07nM, 8,08nM,
8,09nM, 8,1nM, 8,11nM, 8,12nM, 8,13nM, 8,14nM, 8,15nM, 8,16nM, 8,17nM, 8,18nM,
8,19nM, 8,2nM, 8,21nM, 8,22nM, 8,23nM, 8,24nM, 8,25nM, 8,26nM, 8,27nM, 8,28nM,
8,29nM, 8,3nM, 8,31nM, 8,32nM, 8,33nM, 8,34nM, 8,35nM, 8,36nM, 8,37nM, 8,38nM,
8,39nM, 8,4nM, 8,41nM, 8,42nM, 8,43nM, 8,44nM, 8,45nM, 8,46nM, 8,47nM, 8,48nM,
8,49nM, 8,5nM, 8,51nM, 8,52nM, 8,53nM, 8,54nM, 8,55nM, 8,56nM, 8,57nM, 8,58nM,
8,59nM, 8,6nM, 8,61nM, 8,62nM, 8,63nM, 8,64nM, 8,65nM, 8,66nM, 8,67nM, 8,68nM,
8,69nM, 8,7nM, 8,71nM, 8,72nM, 8,73nM, 8,74nM, 8,75nM, 8,76nM, 8,77nM, 8,78nM,
8,79nM, 8,8nM, 8,81nM, 8,82nM, 8,83nM, 8,84nM, 8,85nM, 8,86nM, 8,87nM, 8,88nM,
8,89nM, 8,9nM, 8,91nM, 8,92nM, 8,93nM, 8,94nM, 8,95nM, 8,96nM, 8,97nM, 8,98nM,
8,99nM, 9nM, 9,01nM, 9,02nM, 9,03nM, 9,04nM, 9,05nM, 9,06nM, 9,07nM, 9,08nM, 9,09nM,
9,1nM, 9,11nM, 9,12nM, 9,13nM, 9,14nM, 9,15nM, 9,16nM, 9,17nM, 9,18nM, 9,19nM, 9,2nM,
9,21nM, 9,22nM, 9,23nM, 9,24nM, 9,25nM, 9,26nM, 9,27nM, 9,28nM, 9,29nM, 9,3nM,
9,31nM, 9,32nM, 9,33nM, 9,34nM, 9,35nM, 9,36nM, 9,37nM, 9,38nM, 9,39nM, 9,4nM,
9,41nM, 9,42nM, 9,43nM, 9,44nM, 9,45nM, 9,46nM, 9,47nM, 9,48nM, 9,49nM, 9,5nM,
9,51nM, 9,52nM, 9,53nM, 9,54nM, 9,55nM, 9,56nM, 9,57nM, 9,58nM, 9,59nM, 9,6nM,
9,61nM, 9,62nM, 9,63nM, 9,64nM, 9,65nM, 9,66nM, 9,67nM, 9,68nM, 9,69nM, 9,7nM,
9,71nM, 9,72nM, 9,73nM, 9,74nM, 9,75nM, 9,76nM, 9,77nM, 9,78nM, 9,79nM, 9,8nM,

9,81nM, 9,82nM, 9,83nM, 9,84nM, 9,85nM, 9,86nM, 9,87nM, 9,88nM, 9,89nM, 9,9nM, 9,91nM, 9,92nM, 9,93nM, 9,94nM, 9,95nM, 9,96nM, 9,97nM, 9,98nM, 9,99nM, 10nM, 10,01nM, 10,02nM, 10,03nM, 10,04nM, 10,05nM, 10,06nM, 10,07nM, 10,08nM, 10,09nM, 10,1nM, 10,11nM, 10,12nM, 10,13nM, 10,14nM, 10,15nM, 10,16nM, 10,17nM, 10,18nM, 10,19nM, 10,2nM, 10,21nM, 10,22nM, 10,23nM, 10,24nM, 10,25nM, 10,26nM, 10,27nM, 10,28nM, 10,29nM, 10,3nM, 10,31nM, 10,32nM, 10,33nM, 10,34nM, 10,35nM, 10,36nM, 10,37nM, 10,38nM, 10,39nM, 10,4nM, 10,41nM, 10,42nM, 10,43nM, 10,44nM, 10,45nM, 10,46nM, 10,47nM, 10,48nM, 10,49nM, 10,5nM, 10,51nM, 10,52nM, 10,53nM, 10,54nM, 10,55nM, 10,56nM, 10,57nM, 10,58nM, 10,59nM, 10,6nM, 10,61nM, 10,62nM, 10,63nM, 10,64nM, 10,65nM, 10,66nM, 10,67nM, 10,68nM, 10,69nM, 10,7nM, 10,71nM, 10,72nM, 10,73nM, 10,74nM, 10,75nM, 10,76nM, 10,77nM, 10,78nM, 10,79nM, 10,8nM, 10,81nM, 10,82nM, 10,83nM, 10,84nM, 10,85nM, 10,86nM, 10,87nM, 10,88nM, 10,89nM, 10,9nM, 10,91nM, 10,92nM, 10,93nM, 10,94nM, 10,95nM, 10,96nM, 10,97nM, 10,98nM, 10,99nM, 11nM, 11,01nM, 11,02nM, 11,03nM, 11,04nM, 11,05nM, 11,06nM, 11,07nM, 11,08nM, 11,09nM, 11,1nM, 11,11nM, 11,12nM, 11,13nM, 11,14nM, 11,15nM, 11,16nM, 11,17nM, 11,18nM, 11,19nM, 11,2nM, 11,21nM, 11,22nM, 11,23nM, 11,24nM, 11,25nM, 11,26nM, 11,27nM, 11,28nM, 11,29nM, 11,3nM, 11,31nM, 11,32nM, 11,33nM, 11,34nM, 11,35nM, 11,36nM, 11,37nM, 11,38nM, 11,39nM, 11,4nM, 11,41nM, 11,42nM, 11,43nM, 11,44nM, 11,45nM, 11,46nM, 11,47nM, 11,48nM, 11,49nM, 11,5nM, 11,51nM, 11,52nM, 11,53nM, 11,54nM, 11,55nM, 11,56nM, 11,57nM, 11,58nM, 11,59nM, 11,6nM, 11,61nM, 11,62nM, 11,63nM, 11,64nM, 11,65nM, 11,66nM, 11,67nM, 11,68nM, 11,69nM, 11,7nM, 11,71nM, 11,72nM, 11,73nM, 11,74nM, 11,75nM, 11,76nM, 11,77nM, 11,78nM, 11,79nM, 11,8nM, 11,81nM, 11,82nM, 11,83nM, 11,84nM, 11,85nM, 11,86nM, 11,87nM, 11,88nM, 11,89nM, 11,9nM, 11,91nM, 11,92nM, 11,93nM, 11,94nM, 11,95nM, 11,96nM, 11,97nM, 11,98nM, 11,99nM, 12nM, 12,01nM, 12,02nM, 12,03nM, 12,04nM, 12,05nM, 12,06nM, 12,07nM, 12,08nM, 12,09nM, 12,1nM, 12,11nM, 12,12nM, 12,13nM, 12,14nM, 12,15nM, 12,16nM, 12,17nM, 12,18nM, 12,19nM, 12,2nM, 12,21nM, 12,22nM, 12,23nM, 12,24nM, 12,25nM, 12,26nM, 12,27nM, 12,28nM, 12,29nM, 12,3nM, 12,31nM, 12,32nM, 12,33nM, 12,34nM, 12,35nM, 12,36nM, 12,37nM, 12,38nM, 12,39nM, 12,4nM, 12,41nM, 12,42nM, 12,43nM, 12,44nM, 12,45nM, 12,46nM, 12,47nM, 12,48nM, 12,49nM, 12,5nM, 12,51nM, 12,52nM, 12,53nM, 12,54nM, 12,55nM, 12,56nM, 12,57nM, 12,58nM, 12,59nM, 12,6nM, 12,61nM, 12,62nM, 12,63nM, 12,64nM, 12,65nM, 12,66nM, 12,67nM, 12,68nM, 12,69nM, 12,7nM, 12,71nM, 12,72nM, 12,73nM, 12,74nM, 12,75nM, 12,76nM, 12,77nM, 12,78nM, 12,79nM, 12,8nM, 12,81nM, 12,82nM, 12,83nM, 12,84nM, 12,85nM, 12,86nM, 12,87nM, 12,88nM, 12,89nM, 12,9nM, 12,91nM, 12,92nM, 12,93nM, 12,94nM, 12,95nM, 12,96nM, или 12,97nM).

[0430] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, связывается с (например, с более высокой аффинностью к) подмножеством лигандов рецептора NKG2D. 3D структурные данные в комбинации с анализом мутагенеза показали, что NKG2D является перmissive в распознавании и связывании разнообразного набора своих эндогенных лигандов. Лиганд для NKG2D

может быть экспрессирован на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления лиганд для NKG2D может "сбрасываться" с поверхности клетки и присутствовать в виде растворимого лиганда. Известно, что при некоторых видах рака лиганды NKG2D, такие как MICA, сверхэкспрессируются и в некоторых случаях высвобождаются (например, сбрасываются) в кровоток или окружающие ткани в растворимой форме, например, в сыворотках. Считается, что это способствует, по меньшей мере частично, патогенезу и/или прогрессированию рака. Таким образом, димерный белок, описанный в настоящем документе, применим для связывания такого лиганда, либо присутствующего на клеточной поверхности, либо в виде высвобожденной формы, для уравнивания экспрессии лигандов, которые присутствуют на аномально повышенном уровне, путем функционирования как нейтрализующее средство. Когда лиганд NKG2D экспрессируется на поверхности раковых клеток субъекта, описанный в настоящем документе димерный белок связывается с лигандом клеточной поверхности при введении субъекту. Связывание описанного в настоящем документе димерного белка с его лигандом может предупреждать активацию эндогенных рецепторов NKG2D, присутствующих на NK-клетках. Когда лиганд NKG2D "сбрасывается" из раковых клеток, например, высвобождается в кровоток субъекта, димерный белок, описанный в настоящем документе, связывается с растворимым лигандом, изолируя его от дальнейшего действия.

[0431] В некоторых вариантах осуществления димерный белок, описанный в настоящем документе, характеризуется повышенной способностью к ADCC по сравнению с рецептором NKG2D дикого типа или другим химерным белком, известным в уровне техники.

[0432] Фармацевтические композиции

[0433] В настоящем документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем документе димерный белок (например, димерный белок, продуцируемый в модифицированной клетке CHO) в комбинации по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем.

[0434] "Фармацевтическая композиция" представляет собой состав, содержащий описанный в настоящем документе димерный белок в форме, подходящей для введения субъекту. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в расфасованном виде или в стандартной лекарственной форме. Стандартная лекарственная форма представляет собой любую из множества форм, в том числе, например, лиофилизированный состав, капсулу, пакет для внутривенной инфузии, таблетку, одиночную помпу на аэрозольном ингаляторе или флакон. Количество активного ингредиента (например, состава описанного димерного белка) в стандартной дозе композиции является эффективным количеством и варьируется в зависимости от конкретного применяемого лечения. Специалисту в данной области понятно, что иногда необходимо вносить рутинные изменения в дозу в зависимости от возраста и состояния пациента. Доза будет также зависеть от пути введения. Предусмотрено множество путей,

в том числе пероральный, легочный, ректальный, парентеральный, чрескожный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, ингаляционный, трансбуккальный, сублингвальный, внутриплевральный, интратекальный, интраназальный и т. п. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения по настоящему изобретению включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. В одном варианте осуществления активное соединение смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми необходимыми консервантами, буферами или пропеллентами.

[0435] Используемое в настоящем документе выражение "фармацевтически приемлемый" относится к таким соединениям, анионам, катионам, материалам, композициям, носителям и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями человеческого организма и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

[0436] "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" означает вспомогательное вещество, используемое при получении фармацевтической композиции, которая в целом безопасна, нетоксична и не является нежелательной ни с биологической, ни с иной точек зрения, и включает вспомогательное вещество, приемлемое для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. Фраза "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество", используемая в описании и пунктах формулы изобретения, включает как одно, так и более чем одно такое вспомогательное вещество.

[0437] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению составляют таким образом, чтобы она отвечала требованиям предполагаемого способа введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (местное) и трансмукозальное введение. Растворы или суспензии, которые применяют для парентерального, интрадермального или подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Уровень pH можно регулировать посредством кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения можно заключить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы многократного использования, сделанные из стекла или пластика. В некоторых

вариантах осуществления рН растворов или суспензий, используемых для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, составляет от приблизительно 6 до приблизительно 8 (например, приблизительно 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, или 8).

[0438] Способы и пути применения

[0439] В настоящем документе представлен способ лечения заболевания, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту димерного белка, описанного в настоящем документе, или композиции, описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

[0440] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, заболевание печени, повреждение нерва, наследственную двигательную и сенсорную невропатию, старение или вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0441] В некоторых вариантах осуществления рак, при котором экспрессируется лиганд, представляет собой рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак почки, карциному носоглотки (NPC), рак предстательной железы, меланому, рак плазматических клеток, лейкоз, лимфому, глиому или нейробластому.

[0442] В некоторых вариантах осуществления лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

[0443] В некоторых вариантах осуществления лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

[0444] В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, колит, целиакию, рассеянный склероз, очаговую алопецию, диабет 1 типа, хроническую обструктивную болезнь легких, атеросклероз или метаболический синдром, связанный с диабетом 2 типа.

[0445] В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз печени, гипертензию воротной вены, неалкогольный стеатогепатит (NASH), жировую болезнь печени и цирроз.

[0446] В некоторых вариантах осуществления повреждение нерва представляет собой травматические или токсические повреждения периферических или черепно-мозговых нервов, спинного мозга или головного мозга, черепно-мозговых нервов, черепно-мозговую травму, инсульт, церебральную аневризму, повреждение спинного мозга или повреждение, связанное с первопричинным генетическим заболеванием.

[0447] В некоторых вариантах осуществления наследственная моторная и сенсорная невропатия представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута (например, типа 1А, типа 2, типа 3 с пирамидными признаками или типа б) или болезнь Рефсума.

[0448] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция представляет собой гепатит, вызванную вирусом Эпштейна-Барр или цитомегаловирусом.

[0449] Следует ли конкретному субъекту (например, пациенту) получать противораковую терапию, включающую димерный белок, описанный в настоящем документе, можно определить путем тестирования в отношении aberrантной экспрессии одного или нескольких лигандов NKG2D у субъекта. "Аберрантная экспрессия одного или нескольких лигандов NKG2D" у субъекта означает сверхэкспрессию лиганда(-ов) в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с контрольным уровнем (например, уровнем экспрессии у здорового субъекта). В некоторых вариантах осуществления биологический образец может включать образец биопсии, взятый из ткани субъекта с подозрением на рак. В некоторых вариантах осуществления биологический образец отбирают из солидной опухоли для исследования на злокачественность. В некоторых вариантах осуществления биологический образец может представлять собой образец крови, например сыворотки крови, образец стула, образец мочи и т. д. В некоторых вариантах осуществления биологический образец может представлять собой любой образец клеток или ткани, взятый у субъекта с целью исследования в отношении диагностики или прогрессирования заболевания, такого как рак или аутоиммунное заболевание.

[0450] Специалист в данной области знаком с различными лабораторными методиками и протоколами, используемыми для анализа наличия и уровней одного или нескольких маркеров, присутствующих в биологическом образце. Чтобы определить наличие у субъекта рака, ассоциированного со сверхэкспрессией лиганда(-ов) NKG2D, обычно проводят иммуноаффинные анализы. В определенных ситуациях, в зависимости от типа имеющихся биологических образцов, можно проводить иммуногистологические или иммуноцитохимические анализы. Существует ряд коммерчески доступных антител для выполнения этих анализов. Способы, обычно используемые для этой цели, включают без ограничения ELISA, иммуноблоттинг и иммуногистохимию.

[0451] Описанная в настоящем документе композиция может быть введена непосредственно субъекту. Термины "введение" и "вводить" относятся к способу введения фармацевтического средства субъекту таким образом, чтобы фармацевтическое средство было приведено в контакт с его целевыми клетками, например клетками, связанными с заболеванием, *in vivo*, т. е. в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую NKG2D-Fc, систематически вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления систематическое введение осуществляют посредством внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую димерный белок, вводят местно. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть доставлена непосредственно к солидной опухоли или в

непосредственной близости от нее.

[0452] Любую описанную в настоящем документе композицию можно вводить в любую часть тела субъекта посредством различных путей введения. Композицию можно вводить посредством внутривенной, внутрибрюшинной, внутримышечной, подкожной, внутримышечной, интравенной, интравагинальной, подоболочечной, интратрахеальной, внутрикожной или чрескожной инъекции, перорального или назального введения, ингаляции или постепенной перфузии с течением времени. Композиция может быть доставлена в конкретную ткань. Например, композиция может быть доставлена без ограничения в суставы, слизистую оболочку носа, кровь, легкие, кишечник, мышечные ткани, кожу или брюшную полость млекопитающего. В другом примере аэрозольный препарат композиции можно вводить субъекту путем ингаляции.

[0453] Требуемая доза зависит от пути введения, характера состава, характера болезненного состояния пациента, размера субъекта, веса, площади поверхности, возраста и пола, других вводимых лекарственных средств и решения лечащего врача. Подходящие дозы как правило составляют в диапазоне от приблизительно 0,01 г до приблизительно 5 г (например, приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, или 5 г). В некоторых вариантах осуществления подходящая доза составляет в диапазоне от приблизительно 250 мг до приблизительно 1400 мг (например, приблизительно 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, или 1400). Следует ожидать широких вариаций необходимой дозы ввиду разнообразия доступных композиций на основе димера и различной эффективности различных способов введения. Вариации этих уровней дозы можно регулировать с помощью стандартных эмпирических способов оптимизации, как это хорошо известно специалистам в данной области. Введения могут быть однократными или многократными (например, 2- или 3-, 4-, 6-, 8-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150-кратно или более раз). Инкапсуляция композиции в подходящий носитель для доставки (например, полимерные микрочастицы или имплантируемые устройства) может повысить эффективность доставки.

[0454] Продолжительность лечения при помощи любой композиции, представленной в настоящем документе, может составлять от одного дня до продолжительности жизни хозяина (например, многих лет). Например, композиции на основе димера можно вводить один раз в месяц в течение трех месяцев или один раз в год в течение десяти лет. Также отмечается, что частота лечения может быть переменной. В

некоторых вариантах осуществления композиции на основе димера можно вводить один раз (или два, три раза и т. д.) ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно. В некоторых вариантах осуществления композиции на основе димера можно вводить один раз каждые две недели. Композиции на основе димера можно вводить совместно, например в один и тот же момент времени или последовательно, с одним или несколькими другими видами лечения рака.

[0455] Субъекту можно вводить эффективное количество любой описанной в настоящем документе композиции. Используемый в настоящем документе термин "эффективный" относится к любому количеству, которое вызывает необходимый терапевтический эффект, такой как иммунный ответ, не вызывая при этом значительной токсичности у субъекта. Такое количество можно определить путем оценки биологической реакции субъекта, например иммунного ответа и облегчения симптома, после введения известного количества конкретной композиции. Кроме того, уровень токсичности, если таковой имеется, можно определить путем оценки клинических симптомов субъекта до и после введения известного количества конкретной композиции. Отмечено, что эффективное количество конкретной композиции, вводимой субъекту, можно регулировать в соответствии с необходимым результатом, а также ответом хозяина и уровнем токсичности. Значительная токсичность может варьироваться для каждого конкретного хозяина и зависит от множества факторов, включая, помимо прочего, состояние болезни субъекта, возраст и переносимость боли.

[0456] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает лечение субъекта с помощью дополнительной противораковой терапии или противоракового средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная противораковая терапия представляет собой хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, генную терапию, ДНК-терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, адъювантную терапию или иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия против рака представляет собой химиотерапию, которая повреждает ДНК. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой гетерокомплекс IL-15 (например, GenBank AAX37025)/IL-15Ra (например, GenBank AAP69528.1) (например, гетерокомплексы IL-15/IL-Ra, раскрытые в WO 2007/001677 и WO20007/084342 и/или кодируемые SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой антитело к PD-1 или другой ингибитор PD-1. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD-1, PD-L1 и PD-L2 известны из уровня техники и могут применяться в комбинации с CAR по настоящему изобретению, описанными в настоящем документе. Например, ниволумаб (также называемый BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с PD-1, раскрыты в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой

моноклональное гуманизованное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизованные моноклональные антитела к PD-1 раскрыты в WO2009/101611. Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб и также называемый MK03475; Merck) представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизованные антитела к PD-1 раскрыты в US 8354509 и WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PDL1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой человеческое Fc-оптимизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела к PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и публикации заявки на патент США № 20120039906. Другие средства, связывающиеся с PD-L1, включают YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелой и легкой цепей показаны под SEQ ID NO 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1 105 (также обозначаемое как BMS-936559 и, например, средства, связывающиеся с PD-L1, раскрыты в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO2010/027827 и WO2011/066342) представляет собой растворимый рецептор на основе продукта слияния PD-L2 и Fc, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1. Другие антитела к PD-1 включают AMP 514 (Amplimmune), среди прочих, например, антитела к PD-1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой радиолиганд, такой как без ограничения ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 (оксодотреотид лютеция (117Lu)). В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой противораковую вакцину.

[0457] В некоторых вариантах осуществления дополнительная противораковая терапия предусматривает цитотоксическое средство и/или отличное от цитотоксического средство. "Цитотоксическое средство" относится к веществу, которое ингибирует или предупреждает осуществление функции клеток и/или вызывает разрушение клеток. Предполагается, что этот термин включает радиоактивные изотопы (например, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re), химиотерапевтические средства и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или синтетические токсины или их фрагменты. Отличное от цитотоксического средство относится к веществу, которое не ингибирует или не предупреждает осуществление функции клеток и/или не вызывает разрушения клеток. "Отличное от цитотоксического средство" может включать средство, которое можно активировать для придания ему цитотоксичности. Отличное от цитотоксического средство может включать гранулу, липосому, матрицу или частицу (см., например, публикации патентов США 2003/0028071 и 2003/0032995, которые включены в настоящий документ посредством ссылки). Такие средства могут быть конъюгированы, соединены, связаны или ассоциированы с описанной в настоящем документе композицией на основе димера.

[0458] В некоторых вариантах осуществления традиционные лекарственные препараты против рака вводят вместе с композициями, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении рака, получает композицию на основе димера, описанную в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами, направленными на раковые клетки. Наиболее подходящие средства включают те средства, которые способствуют повреждению ДНК, например, двуцепочечным разрывам клеточной ДНК, в раковых клетках. Можно использовать любую форму повреждающего ДНК средства, известную специалистам в данной области. Повреждение ДНК обычно может быть вызвано лучевой терапией и/или химиотерапией. Повреждающие ДНК средства, также называют генотоксическими средствами. Используемый в настоящем документе термин "в сочетании с" означает, что композицию на основе димера вводят субъекту одновременно с одним или несколькими дополнительными видами лечения (либо одновременно, либо отдельно, но в непосредственной временной близости), до или после введения одного или нескольких дополнительных видов лечения.

[0459] Примеры лучевой терапии включают безограничения внешнюю лучевую терапию и внутреннюю лучевую терапию (также называемую брахитерапией). Источники энергии для внешней лучевой терапии включают рентгеновские лучи, гамма-лучи и пучки частиц, источники энергии, используемые для внутреннего облучения, включают радиоактивный йод (йод или йодид), стронций или радиоизотопы фосфора, палладия, цезия, индия, фосфата или кобальта. Способы проведения лучевой терапии хорошо известны специалистам в данной области.

[0460] Примеры повреждающих ДНК химиотерапевтических средств, которые могут быть особенно применимыми, включают без ограничения: бусульфан (Милеран), карбоплатин (Paraplatin), кармустве (BCNU), хлорамбуцил (Лейкеран), цисплатин (Platmol), циклофосфамид (Cytoxan, Neosar), дакарбазм (DTIC-Dome), ифосфамид (Ifex), ломустме (CCNU), мехлоретам (азотистый иприт, Mustargen), мелфалан (Алкеран) и прокарбазин (Matulane).

[0461] Ряд других химиотерапевтических средств также может быть использован в отношении способа, описанного в настоящем документе, либо по отдельности, либо в комбинации. К ним относятся без ограничения: метотрексат, винкристин, адриамицин, цисплатин, несахарсодержащие хлорэтилнитрозомочевины, 5-фторурацил, митомицин С, блеомицин, доксорубицин, дакарбазин, таксол, фрагилин, мегламин GLA, валрубицин, кармустаин и полиферпосан, MMI270, BAY 12-9566, ингибитор фарнезилтрансферазы RAS, ингибитор фарнезилтрансферазы, MMP, MTA/LY231514, LY264618/лометексол, гламолек, CI-994, TNP-470, гикамтин/топотекан, PKC412, валсподар/PSC833, новантрон/митроксантрон, метарет/сурамин, батимаSTAT, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/мармистат, BB2516/мармистат, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, лемонал DP 2202, FK 317, пицибанил/OK-432, AD 32/валрубицин, метастрон/производное стронция,

темодал/темозоломид, эвацет/липосомальный доксорубин, ютаксан/паклитаксел, таксол/паклитаксел, кселоад/капецитабин, фуртулон/доксифлуридин, циклопакс/паклитаксел пероральный, таксоид пероральный, SPU-077/цисплатин, HMR 1275/флавопиридол, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/ингибитор онкогена RAS, BMS-182751/платина пероральная, UFT (тегафур/урацил), эргамизол/левамизол, энилурацил/776C85/5FU усилитель, кампто/левамизол, камптозар/иринотекан, тумодекс/ралитрекседа, лейстатин/кладрибин, паксекс/паклитаксел, доксил/липосомальный доксорубин, каэликс/липосомальный доксорубин, флудара/флударабин, фармарубин/эпирубин, депоцит, ZD 1839, LU 79553/бис-нафталимид, LU 103793/доластаин, каэтикс/липосомальный доксорубин, гемзар/гемцитабин, ZD 0473/анормед, YM 116, йодированные семена, ингибиторы CDK4 и CDK2, ингибиторы PARP, D4809/дексифозамид, ифес/меснекс/ифосамид, вумон/тенипозид, параплатин/карбоплатин, плантинол/цисплатин, вепезид/этопозид, ZD 9331, таксотер/доцетаксел, пролекарство арабинозида гуанина, аналог таксана, нитрозомочевины, алкилирующие средства, такие как мелфелан и циклофосфамид, аминоклутетимид, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, хлоромбуцил, цисплатин, цитарабин HCl, дактиномицин, даунорубин HCl, эстрамустина фосфат натрия, этопозид (VP16- 213), флоксуридин, фторурацил (5-FU), флутамид, гидроксимочевина (гидроксикарбамид), ифосфамид, интерферон альфа-2а, альфа-2b, ацетат лейпролида (аналог рилизинг-фактора LHRH), ломустин (CCNU), мехлорэтамин HCl (азотистый иприт), меркаптопурин, месна, митоган (о.р'-DDD), митоксантрон HCl, октреотид, пликамицин, прокарбазин HCl, стрептозоцин, тамоксифена цитрат, тиогуанин, тиотепа, винбластин сульфат, амсакрин (м-AMCA), азацитидин, эртропозитин, гексаметилмеламин (НММ), интерлейкин 2, митогуазон (метил-GAG; метилглиоксальбис-гуанилгидразон; MGBG), пентостатин (2'-дезоксикоформин), семустин (метил-CCNU), тенипозид (VM-26) и сульфат виндезина.

[0462] Кроме того, для настоящего изобретения также могут быть использованы следующие средства: алкилирующие средства, такие как карбоплатин и цисплатин, алкилирующие средства азотистого иприта, алкилирующие средства нитромочевины, такие как кармустин (BCNU), антиметаболиты, такие как метотрексат, фолиновая кислота, антиметаболиты пуринового ряда, меркаптопурин, антиметаболиты пиримидинового ряда, такие как фторурацил (5-FU) и гемцитабин (Gemzar®), гормональные противоопухолевые препараты, такие как гозерелин, лейпролид и тамоксифен, природные противоопухолевые препараты, такие как альдеслейкин, интерлейкин-2, доцетаксел, этопозид (VP-16), альфа-интерферон, паклитаксел (Taxol®) и третиноин (ATRA), природные противоопухолевые антибиотики, такие как блеомицин, дактномицин, даунорубин, доксорубин, дауномицин и митомицины, включая митомицин С, и натуральные противоопухолевые средства на основе алкалоидов барвинка, такие как винбластин, винкристин, виндезин, гидроксимочевина, ацетон, адриамицин, ифосфамид, эноцитабин, эпитиостанол, акларубин, анцитабин, нимустин, прокарбазина

гидрохлорид, карбоквон, карбоплатин, кармофур, хромомицин АЗ, противоопухолевые полисахариды, противоопухолевые тромбоцитарные факторы, циклофосфамид (Cytoxan®), шизофиллан, цитарабин (цитозинарабинозид), дакарбазин, тиомозин, тиотепа, тегафур, доластатин, аналоги доластатина, такие как ауристатин, СРТ-11 (иринотекан), митозантрон, винорелбин, тенипозид, аминокптерин, карбомицин, эсперамицины (см., например, патент США № 4675187, который включен в настоящее описание посредством ссылки), неокарзиностаин, ОК 432, блеомицин, фуртулон, броксундин, бусульфан, хонван, пепломицин, бестатин (Ubenimex®), интерферон-β, мепитиостан, митобромтол, мелфалан, ламинин пептиды, лентинан, экстракт *Coriolus versicolor*, тегафур/урацил, эстрамустин (эстроген/мехлорэтамин), талидомид и леналидомид (Revlmid®).

[0463] Другие подходящие химиотерапевтические средства включают средства, ингибирующие протеасомы. Ингибиторы протеасом блокируют действие протеасом, клеточных комплексов, которые расщепляют белки, в частности те короткоживущие белки, которые участвуют в поддержании, росте, делении и гибели клеток. Примеры ингибиторов протеасом включают бортезомиб (Velcade®), лактацистин (AG Scientific, Inc, San Diego, CA), MG1 32 (Biomol International, Plymouth Meeting, PA) PS-519, эпонемицин, эпоксимицин, аклациномицин А, дипептид бензамид, CVT-63417 и винилсульфон трипептидные ингибиторы протеасом.

[0464] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, используются в сочетании с одним или несколькими другими видами лечения рака, включая иммунотерапию рака. Иммунотерапия рака представляет собой применение иммунной системы для отторжения рака. Основной предпосылкой является стимуляция иммунной системы субъекта к атаке опухолевых клеток, ответственных за заболевание. Это может быть выполнено либо путем иммунизации субъекта, и в этом случае собственная иммунная система субъекта распознает опухолевые клетки как мишени для уничтожения, либо путем введения терапевтических веществ, таких как антитела, в качестве лекарственных средств, и в этом случае иммунная система субъекта рекрутируется для уничтожения опухолевых клеток посредством терапевтических средств. Иммунотерапия рака включает терапию на основе антител и терапию на основе цитокинов.

[0465] FDA был одобрен ряд терапевтических моноклональных антител для использования на людях, разработка которых продолжается в настоящее время. Одобренные FDA моноклональные антитела для иммунотерапии рака включают антитела к CD52, CD33, CD20, EgbB2, сосудистому эндотелиальному фактору роста и рецептору эпидермального фактора роста. Таким образом, эти и другие антитела, нацеленные на один или несколько антигенов, ассоциированных с раком, подходят для применения в комбинированной терапии, которую следует вводить в сочетании с композицией на основе димера, описанной в настоящем документе. Примеры моноклональных антител, одобренных FDA для лечения рака, включают без ограничения: ритуксимаб (доступен как Rituxan™), трастузумаб (доступен как Herceptin™), алемтузумаб (доступен как Campath-

ИТTM), цетуксимаб (доступен как ErbituxTM), бевацизумаб (доступен как AvastinTM), панитумумаб (доступен как VectibixTM), гемтузумаб озогамицин (доступен как MylotargTM), ибритумомаб тиуксетан (доступен как ZevalinTM) и тозитумомаб (доступен как ВеххагTM). Примеры моноклональных антител, которые в настоящее время проходят клинические испытания на людях для лечения рака в Соединенных Штатах, включают без ограничения: WX-G250 (доступен как RencarexTM), ипилимумаб (доступен как MDX-010), занолимумаб (доступен как HuMax-CD4), офатунумаб (доступен как HuMax-CD20), ch14.18, залутумумаб (доступен как HuMax-EGFr), ореговомаб (доступен как B43.13, OvalRexTM), эдреколомаб (доступен как IGN-101, PanorexTM), 131I-chTNT-I/B (доступен как CotaraTM), пемтумомаб (доступен как R-1549, TheragynTM), линтузумаб (доступен как SGN-33), лабетузумаб (доступен как hMN14, CEAcideTM), катумаксамаб (доступен как RemovabTM), CNTO 328 (доступен как cCLB8), 3F8, 177Lu-J591, нимотузумаб, SGN-30, тицилимумаб (доступен как CP-675206), даклизумаб (доступен как ZenaraxTM), эпратузумаб (доступен как hLL2, LymphoCideTM), 90Y-эпратузумаб, галиксимаб (доступен как IDEC-114), MDX-060, CT-011, CS-1008, SGN-40, мапатумумаб (доступен как TRM-I), аполизумаб (доступен как Hu1D10, RemitogenTM) и волоциксимаб (доступен как M200).

[0466] Иммуноterapia рака также включает терапию на основе цитокинов. В терапии рака на основе цитокинов используют один или несколько цитокинов, которые модулируют иммунный ответ субъекта. Неограничивающие примеры цитокинов, применимых для лечения рака, включают интерферон-а (IFN-а), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкин-12 (IL-12).

[0467] Полное содержание всех ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно рассматриваемые патентные заявки), приведенных в данной заявке, настоящим явно включено посредством ссылки.

[0468] Также в настоящем документе предусмотрен способ диагностики заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, причем способ включает (1) получение биологического образца от субъекта, имеющего заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D; (2) приведение биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим описанный в настоящем документе димерный белок или описанную в настоящем документе композицию; и (3) обнаружение связывания лиганда NKG2D со связывающим реагентом; где связывание лиганда NKG2D со связывающим реагентом указывает на диагноз заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, у субъекта.

[0469] В некоторых вариантах осуществления лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

[0470] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения в качестве лекарственного препарата.

[0471] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания.

[0472] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

[0473] В настоящем документе предусмотрены описанный в настоящем документе димерный белок, описанный в настоящем документе полинуклеотид, описанный в настоящем документе вектор или описанная в настоящем документе композиция для применения при лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

[0474] Получение димерных белков NKG2D-Fc

[0475] В некоторых вариантах осуществления димерные химерные конструкции NKG2D-Fc получают при помощи стандартных способов рекомбинации ДНК. В некоторых вариантах осуществления димерный белок NKG2D, описанный в настоящем документе, получают в виде отдельного (например, непрерывного) рекомбинантного полипептида. В других вариантах осуществления две или более частей димерного белка NKG2D получают в виде отдельных фрагментов и затем соединяют друг с другом с получением димерной молекулы NKG2D-Fc. В некоторых вариантах осуществления каждую NKG2D-часть димерного белка и Fc-часть димерного белка получают в виде отдельных рекомбинантных полипептидов, затем сливают вместе с помощью средств химического связывания с получением слитого NKG2D-Fc. Эта методика получения может быть предпочтительной, особенно в ситуациях, когда используется непептидная связывающая молекула. Аналогичным образом, эта методика получения также может быть предпочтительной, если димерный белок NKG2D-Fc не сворачивается соответствующим образом (например, неправильно связывает лиганд) при получении в виде одного непрерывного полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый мономер димерного белка (например, NKG2D-часть и Fc-часть) кодируется одной непрерывной последовательностью нуклеотидов и продуцируется в клетках в виде отдельного рекомбинантного полипептида. В некоторых вариантах осуществления димерная молекула NKG2D образуется в результате белок-белкового взаимодействия, например, с помощью Fc-фрагмента.

[0476] Для получения рекомбинантных полипептидов можно использовать различные организмы-хозяева. Подходящие хозяева включают без ограничения: бактерии, такие как *E. coli*, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих. Выбор подходящего организма-хозяина будет зависеть от конкретного пути применения димерного белка NKG2D-Fc. Квалифицированный специалист поймет,

как учитывать определенные критерии при выборе подходящего хозяина для получения рекомбинантного полипептида. Факторы, влияющие на выбор подходящего хозяина, включают, например, посттрансляционные модификации, такие как паттерны фосфорилирования и гликозилирования, а также технические факторы, такие как общий ожидаемый выход и легкость очистки. Специфические для хозяина посттрансляционные модификации димерного NKG2D-Fc, который предназначен для применения *in vivo*, следует тщательно рассматривать, поскольку известно, что некоторые постспецифические модификации обладают высокой иммуногенностью (антигенностью).

[0477] После получения димерный NKG2D-Fc может быть очищен любыми подходящими способами, такими как хроматографические способы, известные специалистам в данной области. Примеры хроматографических способов включают гель-фильтрационную хроматографию. См., например, Caine et al., *Protein Expr. Purif.*, 1996, 8: 159-66. В некоторых вариантах осуществления димерный NKG2D-Fc очищают с помощью иммуноаффинной хроматографии с белком А.

[0478] Как будет понятно специалисту в данной области, части димерной химеры на основе NKG2D также могут быть получены и выделены по отдельности и соединены при помощи химического синтеза.

[0479] Примеры

[0480] Пример 1. Схема конструкций

[0481] Строили модель варианта NKG2D-Fc на основе структурного анализа полноразмерного антитела IgG1 человека (PDB 1HZH) и комплекса NKG2D/MICA (PDB 1HYR) с использованием MOE (Chemical Computing Group ULA). На **фиг. 1А** продемонстрировано схематическое представление варианта NKG2D-Fc. Модель визуализировали посредством системы для графического отображения молекул PyMol (Schroedinger LLC). В модели области, обозначенные синим, представляют собой Fc-часть варианта NKG2D-Fc, области, обозначенные зеленым, представляют собой NKG2D-части варианта NKG2D-Fc, и области, обозначенные оранжевым, представляют собой связанный белок MICA (**фиг. 1В**).

[0482] Пример 2. Конструирование и последовательности

[0483] *Пример 2.1. (фиг. 2А-2В)*

[0484] NKG2D связывается со своими лигандами в виде димера. Когда NKG2D слит с Fc-частью, то димер NKG2D может образовываться либо путем димеризации Fc-фрагмента, либо два NKG2D-фрагмента могут быть соединены пептидным линкером и слиты с Fc-фрагментом, что приводит к образованию бивалентного гомодимерного белка с двумя димерами NKG2D.

[0485] Способность индуцировать передачу сигнала ADCC обоими ранее описанными вариантами, а также варианты N-концевого и C-концевого слияния с Fc испытывали в анализе на основе репортерного гена (RGA).

[0486] Сначала обеспечивали транзientную экспрессию четырех вариантов человеческого димерного NKG2D-Fc в клетках HEK293Т, и проводили их очистку

посредством иммуноафинной хроматографии на основе белка А. 1,5e4 сконструированных стабильных клеток СТ26.WT, сверхэкспрессирующих рекомбинантный человеческий MICA*008 (клетки-мишени), ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax (Gibco), дополненной 10% FBS (аналитическая среда), и помещали в лунки белого 96-луночного планшета. Клетки инкубировали с разными молярными концентрациями вариантов димерного NKG2D-Fc, разведенными в аналитической среде. После одного часа инкубирования 9e4 клеток Jurkat, содержащих FcγRIIIa V158-NFAT-люцефаразу (JNL) (эффektorные клетки), добавляли в экспериментальные лунки, что приводило к получению соотношения клетки-мишени:эффektorные клетки 1:6. Аналитический планшет инкубировали в течение четырех часов при 37°C и 5% CO₂. Зависимую от концентрации активацию рецептора FcγRIIIa обнаруживали путем добавления 60 мкл Bright-Glo™ (Promega) на лунку и инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Полученную люминесценцию измеряли с использованием устройства для считывания планшетов Synergy HT (Biotek). Полумаксимальную эффektorную концентрацию (EC50) в нг/мл определяли по сигналам флуоресценции за вычетом фонового значения (см., например, **фиг. 2А-2В**).

[0487] *Пример 2.2. (фиг. 3А-3В)*

[0488] Проводили анализ связывания на основе активируемой потоком сортировки клеток (FACS) в отношении NKG2D-лигандов мыши, экспрессированных на клеточной поверхности, с получением характеристик связывания вариантов димерного мышинового NKG2D-Fc, слитых либо с N-концом, либо с C-концом Fc-области без пептидного линкера или в присутствии пептидных линкеров разных длин (10, 20 или 30 аминокислот).

[0489] Полумаксимальную эффektorную концентрацию (EC50) в нМ определяли на двух разных линиях сконструированных стабильных клеток СТ26.WT, сверхэкспрессирующих на своей поверхности рекомбинантные лиганды, мышинный Rae-1α и мышинный Rae-1ε. Клетки инкубировали с разными концентрациями белка в DPBS, дополненной 5% FCS и 0,04% NaN₃ (буфер для FACS). Связанные белки выявляли с помощью антитела к Fc мыши, меченного R-фикоэритрином (R-PE) (Jackson ImmunoResearch, ссыл. № 115-115-164). Для каждого примера выводили среднее для полученного значения флуоресценции от живых гейтированных клеток с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro (BD Biosciences).

[0490] Все варианты характеризовались схожим связыванием с Rae-1ε, независимо от длины и ориентации линкера. Напротив, C-концевые варианты с длиной линкера 20 или 30 ак демонстрировали намного сниженное связывание с Rae-1α. Все другие варианты демонстрировали соизмеримое связывание с этим лигандом.

[0491] *Пример 2.3. (фиг. 4А-4D)*

[0492] Способность индуцировать передачу сигнала ADCC посредством вариантов димерного NKG2D-Fc с разной конфигурацией и валентностями NKG2D испытывали в анализе на основе репортерного гена.

[0493] Сначала обеспечивали транзientную экспрессию вариантов в клетках

НЕК293Т, и проводили их очистку посредством иммуноафинной хроматографии на основе белка А.

[0494] 1,5e4 сконструированных стабильных клеток СТ26.WT, сверхэкспрессирующих рекомбинантный человеческий МІСА*008 (клетки-мишени), ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax (Gibco), дополненной 10% FBS (аналитическая среда), и помещали в лунки белого 96-луночного планшета. Клетки инкубировали с разными молярными концентрациями вариантов димерного NKG2D-Fc, разведенными в аналитической среде. После одного часа инкубирования 9e4 клеток Jurkat, содержащих FcγRIIIa V158-NFAT-люцефаразу (JNL) (эффекторные клетки), подвергнутых предварительному блокированию в течение 1-2 часов антителами козы к ULBP2, ULBP5, ULBP6 (Thermo Scientific, ссыл. № PA5-47118), добавляли в экспериментальные лунки, что приводило к получению соотношения клетки-мишени:эффекторные клетки 1:6. В качестве контроля оценивали реактивность вариантов NKG2D-Fc с эффекторными клетками путем инкубирования белков NKG2D-Fc с эффекторными клетками при отсутствии клеток-мишеней (лунки С+Е). Аналитический планшет инкубировали в течение четырех часов при 37°C и 5% CO₂. Зависимую от концентрации активацию рецептора FcγRIIIa обнаруживали путем добавления 60 мкл One-Glo™ (Promega) на лунку и инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Полученную люминесценцию измеряли с помощью устройства для считывания планшетов Synergy HT (Biotek). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) в нг/мл определяли по сигналам флуоресценции за вычетом фонового значения (см., например, **фиг. 4А-4D**).

[0495] Валентность и конфигурация играют роль в способности нацеливаться на клетку и индуцировать уничтожение клеток. На **фиг. 4В** продемонстрировано повышение EC₅₀ на по меньшей мере один log при переходе от моновалентного (НН17) к бивалентному (НН16) связыванию. Неожиданным стало то, что конфигурация молекул, в данном случае НН16 по сравнению с НН8, обеспечивала разницу на по меньшей мере один log в отношении уничтожения клеток (EC₅₀). Дальнейшее повышение валентности от 2 до 4 или другая конфигурация (**фиг. 4С-4D**) не обеспечивали улучшения в отношении уничтожения клеток.

[0496] *Пример 2.4. (фиг. 5А-5D)*

[0497] Анализ протеолитического расщепления и разрушения, происходящих в соответствующем хозяине экспрессии, представляет собой важный параметр для дальнейшей разработки, осуществляемой в этом хозяине экспрессии.

Обеспечивали транзистентную экспрессию вариантов в клетках СНО МаКО посредством проточной электропорации (Maxcyte®), и проводили их очистку посредством иммуноафинной хроматографии на основе белка А.

[0498] Уровень клипированных белков для каждого варианта оценивали посредством LC-MS после полного разложения путем денатурации и дегликозирования белка.

[0499] Проводили анализ прямого связывания в отношении рекомбинантного человеческого лиганда NKG2D с определением, влияет ли делеция длинной пять аминокислот на связывание димерного NKG2D-Fc со своими лигандами.

[0500] Кинетические константы аффинности связывания (K_D) измеряли для фиксированных на белке А вариантов NKG2D-Fc с использованием рекомбинантного человеческого лиганда MICA*001 в качестве аналита. Измерения осуществляли на VIAcore[®] T200 (GE Healthcare, Глаттбругг, Швейцария) при комнатной температуре. Варианты NKG2D-Fc фиксировали на проточных ячейках сенсорного чипа с белком А высокой чистоты (GE Healthcare, ссыл. № 29127555). Все белки разводили в смеси 0,01 М HEPES с pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20. В качестве эталона одну проточную ячейку оставляли пустой без какого-либо фиксированного белка. Данные относительно связывания получали путем последовательного внесения серии разведений аналитов в эталон и измерения характеристик проточной ячейки. Были включены образцы с нулевой концентрацией (только рабочий буфер) с обеспечением двойного контроля во время оценки данных. Для оценки данных использовали сенсограммы с учетом двойного контроля и анализировали константы диссоциации (K_D).

[0501] Специфический сайт протеолитического расщепления можно было идентифицировать посредством LC-MS во втором домене NKG2D (**фиг. 5A-5C**). Путем делеции этого сайта удавалось достичь значительного снижения количества продуктов разрушения (**фиг. 5D**). Как и ожидалось, клиппирование в аминокислотной позиции 149 обеспечивает лишь 6% снижение мономерной фракции, при этом аффинности связывания испытанных образцов, являются соизмеримыми (**фиг. 5D**).

[0502] Пример 3. Формат конструкции

[0503] Материал из клеточной линии при опытно-конструкторском производстве испытывали для подтверждения связывания и активности в отношении уничтожения клеток.

[0504] 1,5e4 сконструированных стабильных клеток ST26.WT (клетки-мишени), сверхэкспрессирующих рекомбинантные лиганды, представляющие собой человеческий MICA*008, человеческий MICA*001, человеческий MICB*001 или MICB05 яванского макака и GUS, нерелевантную мишень, ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax (Gibco), дополненной 10% FBS (аналитическая среда), и помещали в лунки белого 96-луночного планшета. Клетки инкубировали с разными молярными концентрациями вариантов димерного NKG2D-Fc, разведенными в аналитической среде. После одного часа инкубирования 9e4 клеток Jurkat, содержащих FcγRIIIa V158-NFAT-люцефаразу (JNL) (эффektorные клетки), подвергнутых предварительному блокированию в течение 1-2 часов антителами козы к ULBP2, ULBP5, ULBP6 (Thermo Scientific, ссыл. № PA5-47118), добавляли в экспериментальные лунки, что приводило к получению соотношения клетки-мишени:эффektorные клетки 1:6. Аналитический планшет инкубировали в течение четырех часов при 37°C и 5% CO₂. Зависимую от концентрации активацию рецептора

FcyRIIIa обнаруживали путем добавления на лунку 60 мкл One-Glo™ (Promega) и инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Полученную люминесценцию измеряли с помощью устройства для считывания планшетов Synergy HT (Biotek). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) в нг/мл определяли по сигналам флуоресценции за вычетом фонового значения.

[0505] Неожиданным явилось то, что результаты продемонстрировали повышение в по меньшей мере 10 раз активности материала, полученного в СНО, по сравнению с материалом, полученным в НЕК, в случае генетически идентичной конструкции. Полученные результаты сходны для по меньшей мере 2 соответствующих мишеней в организме человека (**фиг. 9E**).

[0506] Пример 4. Получение и клиппирование

[0507] Уровень протеолитического расщепления, в частности для положения 149/150, анализировали в отношении материала, полученного от разных, но генетически идентичных хозяев экспрессии.

[0508] Обеспечивали разложение путем денатурации и дегликозилирование каждой партии белка путем растворения 25 микрограмм в 8 М мочеvine, 0,4 М NH₄CO₃, 0,17 М DTT и нагревания в течение 30 минут при 50°C с последующим 1-часовым инкубированием при 37°C с 1 микрограммом PNGазы F после добавления 40 микролитров воды milliQ. Разложенный путем денатурации, дегликозилированный белок вносили в устройство для жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) (ВЕН С4, 1 мм * 150 мм при УФ при 214 нм, Waters QTOF premier) (см., например, **фиг. 10**).

[0509] 2 мг эталонного образца НН2 (полученного в НЕК-6E) добавляли к 50 мл среды для культивирования клеток DM133 (Irvine Scientific), инокулированной с помощью СНО-С8ТD, СНО-МаКo и СНО-НРТ3 в количестве 2E5 клеток/мл. Встряхиваемые колбы (Corning) культивировали в течение 8 дней при 36,5°C на орбитальном шейкере (Infors HT) при 150 об./мин и 10% CO₂ с наблюдением за плотностью и жизнеспособностью клеток с использованием Beckman Coulter Vicell. Все надосадочные жидкости собирали и замораживали при температуре менее -60°C до осуществления очистки. После размораживания при 30°C на водяной бане надосадочные жидкости подвергали стерилизующей фильтрации перед осуществлением очистки на колонке MabSelect SuRe объемом 1 мл (GE Healthcare) с пошаговым элюированием с использованием 50 мМ уксусной кислоты, рН 3,0. Все элюаты непосредственно титровали до рН 5,0 с помощью 1 М Трис. Отбирали аликвоты для анализов и непосредственно замораживали при температуре менее -60°C до осуществления анализа посредством масс-спектрометрии. 25 мкг белка из каждого образца денатурировали с помощью мочеvine, подвергали разложению с помощью DTT и дегликозилировали с помощью PNGазы F. Все белки последовательно анализировали с помощью системы для LC-MS QTOF Premier (Waters) на колонке ВЕН С4 RP (Waters) с использованием градиента вода/ацетонитрил. Результаты обобщены в **таблице 1** ниже.

Таблица 1. Сводная информация по результатам исследования

клиппирования НН2 при совместном культивировании с СНО

| RT (мин) | Эталон (УФ, %) | Мако (УФ, %) | С8TD (УФ, %) | НРТ3 (УФ, %) |
|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| 5,7 | 0,07 (G236-G514) | 0,75 (V230-G514) | 1 (V230-G514) | 0,57 (V230-G514) |
| | 0,13 (V230-G514) | 0,25 (L229-G514) | 0,5 (L229-G514) | 0,13 (L229-G514) |
| 7,22 | 1,9 (N156-G514) | 5,8 (F155-G514) | 10,8 (F155-G514) | 4,4 (F155-G514) |
| | 3,1 (F155-G514) | | | |
| | 0,8 (S153-G514) | | | |
| 7,97 | | | 4,6 (S141-G514) | |
| 9,41 | 93,9 (F1-G514) | 93 (F1-G514) | 82,9 (F1-G514) | 94,7 (F1-G514) |

[0510] Дальнейшая выработка НН2, НН8, НН8-afuco и НН10 в стабильных клетках СНО-МаКО подтверждала первичные результаты анализа совместного культивирования. Только небольшие количества клиппированных продуктов (низкие уровни составляют 1% или ниже) выявляли посредством анализов RP-MS для всех предоставленных образцов.

[0511] Способ 1 (RP-MS с восстановлением и алкилированием) 400 мкг белка разводили водой Milli-Q до достижения общего объема 356 мкл, и pH регулировали путем добавления 20 мкл 1 М Трис, pH 8,0. Дегликозилирование проводили путем добавления 24 мкл PNGазы F (GNF, 1 мг/мл) и инкубирование проводили в течение ночи при 37°C. 44 мкл дегликозилированного образца смешивали с 50 мкл 8 М гуанидин-HCl, 5 мкл 1 М Трис, pH 8,0, 1 мкл 1 М DTT. После инкубирования в течение 1 часа при 37°C непосредственно добавляли 2 мкл 1 М IAM и инкубирование проводили в течение еще 1 часа при комнатной температуре в темном месте. 1 мкл 1 М DTT в конце добавляли к образцу с гашением алкилирования и 3 мкг белка затем анализировали с помощью системы LC-MS QTOF (Waters) на колонке PLRP-S (Agilent) при 60°C с использованием градиента вода/изопропанол и ацетонитрил.

[0512] Способ 2 (RP-MS с восстановлением) 100 мкг белка разводили 1:18 водой Milli-Q до достижения общего объема 9 мкл, и pH регулировали путем добавления 1,7 мкл 0,5М Трис, pH 7,5. Дегликозилирование проводили путем добавления 6 мкл PNGазы F (GNF, 1 мг/мл) и 1 мкл EndoH (NEB, 125000 ед./мл). Образцы инкубировали в течение ночи при 37°C. 7,3 мкл дегликозилированного образца смешивали с 50 мкл 8 М гуанидин-HCl, 5 мкл 1 М Трис, pH 8,0, 1 мкл 1 М DTT и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Непосредственно добавляли 1 мкл 10% TFA к образцу. 3 мкг белка затем анализировали с помощью системы LC-MS QTOF (Waters) на Acquity CSH C18 (Waters) при 80°C с

использованием градиента вода/изопропанол и ацетонитрил.

[0513] Пример 5. Связывание in vitro

[0514] Анализ прямого связывания проводили с получением характеристик связывания вариантов NKG2D-Fc, усиленных в отношении ADCC, а также относящихся к дикому типу, с лигандами, представленными рекомбинантными человеческими MICA*001 и MICB*001. Варианты NKG2D-Fc использовали, во-первых, в качестве лиганда для получения характеристик связывания каждого димера NKG2D с MICA и MICB (конфигурация для моновалентного связывания) и, во-вторых, в качестве аналита с целью определения эффекта в отношении связывания в случае наличия двух гомодимеров (конфигурация для бивалентного связывания).

[0515] В случае конфигурации для моновалентного связывания кинетические константы аффинности связывания (K_D) измеряли для фиксированных на белке А вариантов NKG2D-Fc с использованием рекомбинантных человеческих лигандов NKG2D в качестве аналита. Измерения осуществляли на BIAcore® T200 (GE Healthcare, Глаттбругг, Швейцария) при комнатной температуре. Варианты NKG2D-Fc фиксировали на проточных ячейках сенсорного чипа с белком А высокой чистоты (GE Healthcare, ссыл. № 29127555). Все белки разводили в смеси 0,01 М HEPES с pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20. В качестве эталона одну проточную ячейку оставляли пустой без какого-либо фиксированного белка. Данные относительно связывания получали путем последовательного внесения серии разведений аналитов в эталон и измерения характеристик проточной ячейки. Были включены образцы с нулевой концентрацией (только рабочий буфер) с обеспечением двойного контроля во время оценки данных. Для оценки данных использовали сенсограммы с учетом двойного контроля и анализировали константы диссоциации (K_D).

[0516] В случае конфигурации для бивалентного связывания кинетические константы аффинности связывания (K_D) измеряли для фиксированных на стрептавидине рекомбинантных человеческих лигандов NKG2D с использованием вариантов NKG2D-Fc в качестве аналита. Измерения осуществляли на BIAcore® T200 (GE Healthcare, Глаттбругг, Швейцария) при комнатной температуре. Все белки разводили в смеси 0,01 М HEPES с pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20. Биотинилированные лиганды NKG2D ковалентно фиксировали в проточных ячейках сенсорного чипа SA с высокой чистотой (GE Healthcare, № 29104992) с использованием стандартной процедуры в соответствии с рекомендациями производителя (GE Healthcare). В качестве эталона иммобилизирование для одной проточной ячейки осуществляли в пустом состоянии. Данные относительно связывания получали путем последовательного внесения серии разведений аналитов в эталон и измерения характеристик проточной ячейки. Были включены образцы с нулевой концентрацией (только рабочий буфер) с обеспечением двойного контроля во время оценки данных. Для оценки данных использовали сенсограммы с учетом двойного контроля и анализировали константы диссоциации (K_D).

[0517] В случае конфигурации для бивалентного связывания все 3 проанализированных образца (НН8 с IgG1-Fc дикого типа, НН10 с IgG1-Fc_SD1E и НН8_afuc с IgG1-Fc дикого типа с низким содержанием фукозы) демонстрировали соизмеримое связывание в субнанолярном диапазоне для обоих лигандов, МІСА*001 и МІСВ*001. Как и ожидалось, измеренные значения аффинности являются более низкими в случае конфигурации для моновалентного связывания вследствие эффекта avidности. В данном случае связывание всех образцов с МІСА*001 находится в нМ-диапазоне двухзначных значений, в то же время связывание с МІСВ*001 снижено в 2 раза.

Таблица 2. Бивалентное и моновалентное связывание

| Образец | Лиганд | Бивалентное связывание | | | Моновалентное связывание |
|-----------|-----------|------------------------|----------|---------|--------------------------|
| | | ka (1/Мс) | kd (1/с) | KD (нМ) | KD (нМ) |
| НН8 | hMICA*001 | 4,83E+06 | 8,14E-04 | 0,79 | 60 |
| | hMICB*001 | 3,89E+06 | 0,002815 | 0,89 | 114 |
| НН10 | hMICA*001 | 1,11E+06 | 9,07E-04 | 0,82 | 77,5 |
| | hMICB*001 | 6,22E+06 | 0,003277 | 0,53 | 86 |
| НН8-AFUCO | hMICA*001 | 7,55E+05 | 0,001067 | 1,41 | 70 |
| | hMICB*001 | 3,93E+06 | 0,004109 | 1,05 | 104 |

[0518] 6е6 клеток 293FT (Invitrogen) помещали в чашку диаметром 10 см с 10 мл cD10, затем через 3 часа среду заменяли на 5 мл предварительно нагретой Opti-MEM1. Осуществляли трансфекцию клеток через 4 часа после добавления OptiMem-1 с помощью ДНК-плазмид, кодирующих указанные лиганды, с использованием липофектамина-2000 в соответствии с инструкциями производителя. После инкубирования в течение ночи клетки собирали с последующим осуществлением двух процедур промывки с помощью 5 мл PBS+2 mM EDTA. Клетки подсчитывали на устройстве для подсчета клеток Nexcelom, и 100e3 клеток ресуспендировали в смеси PBS+2 mM EDTA+2% фетальная бычья сыворотка (буфер для FACS) с 10 мкг/мл НН8 или 10 мкг/мл изотипического контроля в виде человеческого IgG1. Клетки окрашивали в течение 15 минут при 4 градусах, затем один раз промывали в 200 мкл буфера для FACS и окрашивали вторичным антителом, представляющим собой меченное Alexa488 антитело козы к huIgG (A11013, Thermo Fisher), в течение 15 минут при 4 градусах. Затем клетки один раз промывали 200 мкл буфера для FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, и фиксировали путем добавления 100 мкл фиксирующего буфера IC (eBioscience) перед осуществлением прогона в BD Fortessa, и анализировали в Flowjo (см., например, **фиг. 11А-11В**).

[0519] 6е6 клеток 293FT (Invitrogen) помещали в чашку диаметром 10 см с 10 мл cD10, затем через 3 часа среду заменяли на 5 мл предварительно нагретой Opti-MEM1. Осуществляли трансфекцию клеток через 4 часа после добавления OptiMem-1 с помощью ДНК-плазмид, кодирующих указанные лиганды, с использованием липофектамина-2000 в соответствии с инструкциями производителя. После инкубирования в течение ночи клетки собирали с последующим осуществлением двух процедур промывки с помощью 5 мл PBS+2 mM EDTA. Клетки подсчитывали на устройстве для подсчета клеток Nexcelom, и 100e3 клеток ресуспендировали в смеси PBS+2 mM EDTA+2% фетальная бычья сыворотка (буфер для FACS) с 10 мкг/мл НН8 или 10 мкг/мл изотипического контроля в виде человеческого IgG1. Клетки окрашивали в течение 15 минут при 4 градусах, затем один раз промывали в 200 мкл буфера для FACS и окрашивали вторичным антителом, представляющим собой меченное Alexa488 антитело козы к huIgG (A11013, Thermo Fisher), в течение 15 минут при 4 градусах. Затем клетки один раз промывали 200 мкл буфера для FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, и фиксировали путем добавления 100 мкл фиксирующего буфера IC (eBioscience) перед осуществлением прогона в BD Fortessa, и анализировали в Flowjo (см., например, **фиг. 12А-12В**).

[0520] 1e6-5e6 опухолевых клеток высевали непосредственно в 25 мл DMEM+10% FBS в колбе T-75 и затем культивировали при 37 градусах в 5% CO₂. Через 72 часа клетки собирали путем перенесения пипеткой в PBS+2 mM EDTA. Нормальные донорские PBMC собирали из лейкопаков (NemaCare) и очищали с помощью Ficoll. Клетки подсчитывали на устройстве для подсчета клеток Nexcelom и 100e3 клеток ресуспендировали в смеси PBS+2 mM EDTA+2% фетальная бычья сыворотка (буфер для FACS) с 5 мкл TruStain FcX (eBioscience) в течение 15 минут при 4 градусах Цельсия. Затем клетки центрифугировали и ресуспендировали в смеси буфер для FACS+10 мкг/мл НН8 или 10 мкг/мл изотипического контроля в виде человеческого IgG1. Клетки окрашивали в течение 15 минут при 4 градусах, затем один раз промывали в 200 мкл буфера для FACS и окрашивали вторичным антителом, представляющим собой меченное Alexa488 антитело козы к huIgG (A11013, Thermo Fisher), в течение 15 минут при 4 градусах. Затем клетки один раз промывали 200 мкл буфера для FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, и фиксировали путем добавления 100 мкл фиксирующего буфера IC (eBioscience) перед осуществлением прогона в BD Fortessa, и анализировали в Flowjo (см., например, **фиг. 13А-13В**).

[0521] Пример 6. Функциональная активность in vitro

[0522] Первичные NK-клетки человека из лейкопаков очищали и замораживали в смеси 90% фетальной бычьей сыворотки+10% DMSO. NK-клетки размораживали с внесением в смесь, предусматривающую RPMI, не содержащую феноловый красный, + 10% инактивированной нагреванием FBS+50 mM бета-меркаптоэтанола+50 ME/мл IL-2 человека (Corning) (аналитическая среда), в день анализа. Клетки CT26.WT, сконструированные с обеспечением сверхэкспрессии указанного NKG2D-L, культивировали в аналитической среде, а затем собирали с помощью PBS+2 mM EDTA. 50000 NK-клеток и 25000 клеток CT26.WT добавляли в каждую лунку, а также добавляли

разведения антител NKG2D-Fc, как указано. Аналитическую смесь затем инкубировали при 37 градусах Цельсия+5% CO₂ в течение 24 часов. Затем неслипшиеся клетки собирали и окрашивали с помощью APC-Cy7 к CD45 (eBioscience HI-30) и APC к NKG2D (eBioscience 1D11) в течение 15 минут с последующим промыванием и фиксацией, а затем анализировали на BD Fortessa и Flowjo. Медианную интенсивность флуоресценции NKG2D для CD45+ нормализовали по изотипическому контролю (100%) или дезактивации, основанной на использовании гранул (0%) (см., например, **фиг. 14А-14В**).

[0523] Пример 7. Функциональная активность in vivo - ADCC

[0524] Усиленное связывание с рецептором Fc-гамма также приводит к повышению активности ADCC вследствие более сильной активации рецепторов на эффекторных клетках, что испытывали в условиях с использованием клеточной линии, сверхэкспрессирующей человеческий MICA*008, в качестве линии клеток-мишеней в клеточном RGA (**фиг. 15**).

[0525] 1,5e4 сконструированных стабильных клеток CT26.WT, сверхэкспрессирующих рекомбинантный человеческий лиганд MICA*008 (клетки-мишени), ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax (Gibco), дополненной 10% FBS (аналитическая среда), и помещали в лунки белого 96-луночного планшета. Клетки инкубировали с разными молярными концентрациями вариантов димерного NKG2D-Fc, разведенными в аналитической среде. После одного часа инкубирования 9e4 клеток Jurkat, содержащих FcγRIIIa V158-NFAT-люцефаразу (JNL) (эффекторные клетки), добавляли в экспериментальные лунки, что приводило к получению соотношения клетки-мишени:эффекторные клетки 1:6. Аналитический планшет инкубировали в течение четырех часов при 37°C и 5% CO₂. Зависимую от концентрации активацию рецептора FcγRIIIa обнаруживали путем добавления на лунку 60 мкл One-Glo™ (Promega) и инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Полученную люминесценцию измеряли с помощью устройства для считывания планшетов Synergy HT (Biotek). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) в нг/мл определяли по сигналам флуоресценции за вычетом фонового значения.

[0526] Версия NKG2D-Fc (NH10) с мутациями, усиливающими связывание с рецептором Fc-гамма, продемонстрировала в 10 раз более сильную активность в отношении уничтожения клеток по сравнению с версией NKG2D-Fc, содержащей IgG1-Fc дикого типа (NH8). Версия NKG2D-Fc, содержащая мутации, подавляющие связывание с рецептором Fc-гамма, не демонстрировала активности в отношении уничтожения клеток (**фиг.15**). Образец NKG2D-Fc, содержащий IgG1 дикого типа, полученный путем экспрессии в НЕК, демонстрировал в по меньшей мере 10 раз более низкую активность в отношении уничтожения клеток, как уже показано на **фиг. 9**.

Таблица 3. RGA на основе CD16 человека для оценки димеров NKG2D-Fc, экспрессируемых в клетках CHO Мако

| EC50 (нг/мл) | Уничтожение согласно hRGA | | | |
|-------------------------------|---------------------------|------|------|-----|
| | НН8 | НН10 | НН2 | НН5 |
| Линия клеток-мишеней/кандидат | | | | |
| hULBP1 | 5,0 | 0,3 | 8,3 | 1,2 |
| hULBP2 | 10 | 1,2 | 15 | 0,9 |
| hMICA008 | 3,5 | 0,2 | 4,7 | 1 |
| hMICB001 | 35 | 9,5 | 91 | 16 |
| cyMICA08 | 2,1 | 0,3 | 7,3 | 0,2 |
| cyMICB05 | 194 | 145 | 1347 | 89 |
| GUS=отрицательный контроль | / | / | / | / |

[0527] Активность ADCC для вариантов NKG2D-Fc, усиленных в отношении ADCC (НН10 и НН8-AFUСO) и относящихся к дикому типу (НН8), определяли с помощью анализа ADCC *in vitro* (фиг. 16А-16D), такого как описанный в патентах США № 5500362 или 5821337, с использованием линии эффекторных клеток, экспрессирующих CD16 человека. Биологическую активность ADCC для вариантов NKG2D-Fc измеряли на основе их способности индуцировать ADCC в присутствии экспрессирующих лиганд NKG2D клеток-мишеней и эффекторных NK-клеток. Меченные кальцеином клетки СТ26.WT, стабильно трансфицированные с помощью человеческих MICA*008, MICB*001, ULBP1 или ULBP2, инкубировали с разными концентрациями вариантов NKG2D-Fc и избыточным количеством естественных киллерных клеток, в данном случае линией клеток NK3.3 (Saint Louis University, № SLU-1011). Клетки промывали и ресуспендировали в среде RPMI, не содержащей фенол, с достижением соотношения клеток-мишеней и эффекторных клеток 1:20. Аналитическую среду дополняли 1,5 мМ пробенецидом (Invitrogen, ссыл. № P36400) с целью снижения спонтанного выброса кальцеина из клеток-мишеней. Зависимое от концентрации уничтожение клеток-мишеней СТ26.WT анализировали через один с половиной часа инкубирования при 37°C/5% CO₂ путем измерения выброса кальцеина из уничтоженных клеток в каждой лунке. Каждый аналитический планшет включал комбинацию экспериментальных и контрольных лунок. Использовали несколько разных типов контрольных лунок для учета (i) спонтанного выброса кальцеина из клеток-мишеней (спонтанный для клеток-мишеней) и (ii) максимального выброса кальцеина из клеток-мишеней (максимум для клеток-мишеней). Значение специфического уничтожения в процентах рассчитывали следующим образом (экспериментальное значение - спонтанный для клеток-мишеней) / (максимум для клеток-мишеней - спонтанный для клеток-мишеней). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) в нг/мл определяли для каждой линии клеток-мишеней.

[0528] 10000 клеток НСТ-116 или OVCAR-3 помещали в 96-луночный планшет в 50 мкл сR10 с низким содержанием IgG+50 мкМ 2-ME+100 ME/мл IL-2 человека и инкубировали в течение 51 часа при 37 градусах на ACEA xCelligence. Через 51 час после

высева опухолевых клеток $100e3$ NK-клеток и NKG2D-Fc в указанной концентрации добавляли в объеме 50 мкл с конечный объемом аналитической среды, составившим 100 мкл. Уничтожение считывали через 72 часа после высева опухолевых клеток или 21 час после добавления NK-клеток и значения нормализовали путем установки импеданса перед добавлением NK-клеток как 100% живых и импеданса перед добавлением опухолевых клеток как 0% живых. Через 96 часов после добавления NK-клеток неслипшуюся фракцию в лунках выделяли для проточной цитометрии, и окрашивали антителом к CD56 (eBioscience CMSSB PE-Cy7), антителом к CD69 (eBioscience H1.2F3 FITC), антителом к CD45 (eBioscience HI30 APC-Cy7), антителом к NKG2D (Thermo Fisher 1D11 BV421) и синим красителем Live/Dead (Thermo Fisher L34962), и анализировали на Becton Dickinson Fortessa и Flowjo (TreeStar) (см., например, **фиг. 17A-17E**).

[0529] Первичные макрофаги мыши получали из промытого костного мозга бедренной кости мыши, культивированного при $4e6/10$ мл cR10+50 нг/мл M-CSF (Peprotech)/чашка диаметром 10 см. Среду обновляли каждые два дня до достижения общей продолжительности культивирования, составляющей 2 недели. После первой недели культивирования дополнительное количество M-CSF не добавляли. Макрофаги собирали через две недели с использованием скребка для сбора клеток и метили фиолетовым красителем CellTrace (Life Technologies) при 10 мкМ в RPMI 1640+10% FBS. Клетки CT26.WT, трансдуцированные со сверхэкспрессией человеческого ULBP2, метили с помощью CFSE при 1 мкМ в RPMI 1640+10% FBS. 50000 клеток CT26.WT помещали в 96-луночный планшет с v-образным дном и макрофаги мыши добавляли при соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени 2:1. Затем добавляли NKG2D-Fc в указанной концентрации. Клетки инкубировали в течение 2,5 часа при 37 градусах, а затем осаждали путем центрифугирования и окрашивали с помощью 1 мкг/мл 7-AAD в 100 мкл PBS+2% FBS+2 mM EDTA непосредственно перед проточным анализом. Подвергшиеся фагоцитозу клетки (CFSE+, фиолетовый краситель CellTrace+) количественно оценивали с помощью проточной цитометрии на BD Fortessa и анализировали в Flowjo (см, например, **фиг. 18**).

[0530] $1,5e4$ сконструированных стабильных клеток CT26.WT, сверхэкспрессирующих рекомбинантные лиганды NKG2D человека и яванского макака (клетки-мишени), ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax (Gibco), дополненной 10% FBS (аналитическая среда), и помещали в лунки белого 96-луночного планшета. Клетки инкубировали с разными молярными концентрациями вариантов димерного NKG2D-Fc, разведенными в аналитической среде. После одного часа инкубирования $9e4$ клеток Jurkat, содержащих FcγRIIIa V158-NFAT-люцефаразу (JNL) (эффекторные клетки), добавляли в экспериментальные лунки, что приводило к получению соотношения клетки-мишени:эффекторные клетки 1:6. Аналитический планшет инкубировали в течение четырех часов при 37°C и 5% CO₂. Зависимую от концентрации активацию рецептора FcγRIIIa обнаруживали путем добавления на лунку 60 мкл One-Glo™ (Promega) и инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Полученную люминесценцию измеряли с помощью устройства для считывания

планшетов Synergy HT (Biotek). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) в нг/мл определяли по сигналам флуоресценции за вычетом фонового значения (см., например, **фиг. 19А-19F**).

Таблица 4. Значения EC50 для ADCC для молекулы НН8 и молекулы НН10

| EC50 (nM) | НН8 | НН10 |
|------------|-------|-------|
| huMICA*008 | 30 | 1,33 |
| huMICB*001 | 30 | 8,21 |
| huULBP1 | 43 | 2,71 |
| huULBP2 | 93 | 10,47 |
| cyMICA*08 | 18 | 2,30 |
| cyMICB*05 | 1,675 | 1,248 |

[0531] Пример 8. PK in vivo

[0532] Самкам мышей C57Bl/6 возрастом 8-10 недель вводили указанные белки в количестве 5 мг/кг. В указанные моменты времени из хвостовой вены отбирали объем крови, достаточный для получения 20-25 мкл сыворотки крови, и центрифугировали с отделением сыворотки крови. Затем сыворотку крови замораживали, а затем последовательно размораживали. IgG1 человека количественно оценивали с использованием планшета со стрептавидином MSD, покрытого биотинилированным антителом к иммуноглобулину человека (Southern Biotech, 2049-08), добавления сыворотки крови мыши и проведения обнаружения с помощью SulfoTAG-меченного антитела к иммуноглобулину человека (Southern Biotech, 2049-01), а также обнаружения сигнала в соответствии с инструкциями производителя. Затем образцы считывали и количественно оценивали на приборе MSD. Исходная PK у мыши в случае введения НН8 и SQX244 в дозе 5 мг/кг с использованием материала, полученного из клеток НЕК, демонстрировала быстрое выведение NKG2D-Fc и короткий период полужизни в сыворотке крови. По сравнению с НЕК материал, полученный из клеток CHO, характеризовался значительно улучшенной PK в организме мыши и NHP. НН8 и SQX244 из CHO характеризовались PK, аналогичной таковой для изотипического контроля в виде IgG, с немного более быстрой фазой распределения. Не наблюдали быстрого выведения вследствие опосредованного мембраной мишени распределения препарата (TMDD) при испытываемых дозах и не выявляли каких-либо антител к лекарственному средству (ADA) в NHP. Гиперсиалирование в CHO-HySi не оказывало дополнительного эффекта в отношении PK, и поэтому CHO-HySi исключали из дальнейшего получения характеристик на передовой фазе разработки (см., например, **фиг. 20А-20В**).

Таблица 5. Параметры PK

| Средние значения параметров РК в организме мыши после введения дозы 5 мг/кг НН8 | Tmax (ч) | Cmax (мкг/мл) | AUC (мкг*ч/мл) | CL (мл*ч/кг) | Vz (мл/кг) |
|---|----------|---------------|--------------------|--------------|------------|
| Среднее значение | 0,5 | 97,3 | AUClast=4180 | 0,684 | 147 |
| Параметры РК в организме яванского макака после введения дозы 1 мг/кг НН8 | 0,25 | 22,9 | AUC0-168 ч=1320 | | |

[0533] Самкам яванского макака возрастом 52-77 месяцев вводили 1-100 мг/кг НН8. В указанные моменты времени из бедренной вены отбирали объем крови, достаточный для получения 200-250 мкл сыворотки крови, и центрифугировали с отделением сыворотки крови. Затем сыворотку крови замораживали, а затем последовательно размораживали. IgG1 человека количественно оценивали с использованием фиксирования Fc или фиксирования мишени. Для фиксирования Fc покрытый стрептавидином планшет покрывали биотинилированным антителом к иммуноглобулину человека (Southern Biotech, 2049-08), а для фиксирования, предусматривающего использование мишени, микротитровальный планшет непосредственно покрывали с помощью MICA. Затем добавляли сыворотку крови яванского макака и осуществляли выявление с помощью HRP-конъюгированного антитела к иммуноглобулину человека (Southern Biotech, 2049-05). Сигнал измеряли с использованием считывания колориметрических данных. Отдельные данные относительно РК в организме яванского макака, полученные из анализа РК на основе фиксации Fc, наносили на график вместе с прогнозируемой РК для типичного IgG в организме яванских макаков. Прогнозируемая РК для типичного IgG в организме яванских макаков была основана на двухкомпонентной модели РК, при этом $V1=41$ мл/кг, $V2=44$ мл/кг, $CL=6$ мл/день/кг и $Q=17$ мл/день/кг, для нечеловекообразной обезьяны весом 3 кг (Dostalek M et al., mAbs, 2017). РК НН8 в основном была соизмеримой с РК для типичного антитела IgG с отличием, представленным немного более быстрой фазой распределения и выведения (см., например, **фиг. 21А-21В**).

[0534] Пример 9. PD in vivo

[0535] Клетки CT26.WT (ATCC) конструировали с обеспечением сверхэкспрессии человеческого ULBP2 и размножали в смеси RPMI-1640+10% инактивированной нагреванием FBS. 1еб клеток подкожно имплантировали в верхнюю левую боковую область мышцей Balb/c возрастом 6-8 недель (Jackson). Начиная со дня 0 мышам путем

инъекции вводили 5 мг/кг изотипического контроля в виде человеческого IgG1 или НЕК НН8 внутривенно. Такое введение путем инъекции повторяли каждые два дня, при этом общее количество доз составляло 6. Через 2 дня после 6-й дозы опухоли собирали и подвергали расщеплению до суспензии отдельных клеток, окрашивали антителом к CD45, антителом к NKp46 и антителом к CD8 и анализировали на BD Fortessa и Flowjo. NK-клетки идентифицировали как NKp46+CD45+ клетки. CD8+ Т-клетки идентифицировали как CD8+CD45+ клетки и количественно оценивали процент инфильтрации в опухоль (см., например, **фиг. 22А-22В**).

[0536] Клетки EL4 конструировали с обеспечением сверхэкспрессии человеческого MICA*001. Эти клетки размножали в смеси DMEM+10% инактивированной нагреванием FBS перед имплантацией 500е3 клеток подкожно в верхнюю правую боковую область мышью C57Bl/6 возрастом 6-8 недель (Jackson). Затем мышам вводили дозу 20 мг/кг НН8 или изотипического контроля в виде человеческого IgG1 через 2 дня после имплантации опухоли, и опухоли собирали с использованием ферментного расщепления через 5 дней, окрашивали антителом к CD69, антителом к NKG2D, антителом к CD45, антителом к NKp46 и анализировали на BD Fortessa и Flowjo. NK-клетки идентифицировали как NKp46+CD45+ клетки. Рассчитывали медианную интенсивность флуоресценции CD69 и NKG2D, и результаты представлены в настоящем документе (см., например, **фиг. 23А-23В**).

[0537] Пример 10. Эффективность in vivo

[0538] Клетки EL4 конструировали с обеспечением сверхэкспрессии человеческого MICA*001. Эти клетки размножали в смеси DMEM+10% инактивированной нагреванием FBS перед имплантацией 500е3 клеток подкожно в верхнюю правую боковую область мышью C57Bl/6 возрастом 6-8 недель (Jackson). Затем мышам вводили дозу 5 мг/кг НН8, НН10 или изотипического контроля в виде человеческого IgG1 через 2, 9 и 16 дней после имплантации опухоли. Опухоли измеряли штангенциркулем и выживаемость рассчитывали как время до достижения опухолью объема 1000 мм3 (см., например, **фиг. 24А-24В**).

[0539] **Таблица 6. Перечень последовательностей**

| Название | Последовательность | SEQ ID NO | | |
|-----------------------------|--------------------|------------|------------|---|
| Белок hNKG2D(ак 78-216) +RS | FLNSLFNQEV | QIPLTESYCG | PCPKNWICYK | 1 |
| | NNCYQFFDES | KNWYESQASC | MSQNASLLKV | |
| | YSKEDQDLLK | LVKSYHWMGL | VHIPTNGSWQ | |
| | WEDGSILSPN | LLTIEMQKG | DCALYASSFK | |
| | GYIENCSTPN | TYICMQRTVR | S | |

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| Белок hNKG2D(ак 84-216) +RS | <p>NQEV QIPLTESYCG PCPKNWICYK NNCYQFFDES KNWYESQASC MSQNASLLKV YSKEDQDLLK LVKSYHWMGL VHIPTNGSWQ WEDGSILSPN LLTIEMQKG DCALYASSFK GYIENCSTPN TYICMQRTRV S</p> | 2 |
| Белок mNKG2D (ак 94-232) | <p>FQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCY QFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFL KLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQL TLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAV</p> | 3 |
| Белок mNKG2D (полноразмерный) | <p>MALIRDRKSHHSEMSKCHNYDLKPAKWDTSEEQ QKQRLALTTSQPGENGIIRGRYPKIEKLIKISPMFVVR VLAIALAIRFTLNTLMWLAIFKETFPVLCNKEVP VSSREGYCGPCPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWN QSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFLKLKLVKSYHWM GLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQLTLVEIPKGSC AVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMKRAV</p> | 4 |
| Fc белка HH8 hFc1 | <p>DK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK</p> | 5 |
| Fc белка HH10 hFc1 SDIE | <p>DK THTCPPCPAP ELLGGPDVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPE EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL</p> | 6 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| | HNHYTQKSLS LSPGK | |
| mFc2 | ISAMVRSRPGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK | 63 |
| hLC-каппа | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC | 64 |
| CH-hFc1 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 65 |
| (GS) _n | (GS) _n , n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 | 7 |
| (G4S) _n | (GGGS) _n , n=1, 2, 3, 4 или 5 | 8 |
| (G3S) _n | (GGGS) _n , n=1, 2, 3, 4 или 5 | 9 |
| (G3S) ₂ | GGSGGGGS | 10 |

| | | |
|--|--|----|
| G4S | GGGGS | 11 |
| (G4A) _n | (GGGGA) _n , n=1, 2, 3, 4 или 5 | 12 |
| (G4P) _n | (GGGGP) _n , n=1, 2, 3, 4 или 5 | 13 |
| (G3A) _n | (GGGA) _n , n=1, 2, 3, 4 или 5 | 14 |
| G3S | GGGS | 66 |
| GGPLGL W AGG | GGPLGL W AGG | 15 |
| IEGR | IEGR | 16 |
| HH1, белок hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1 | FLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQ FFDESKNWAYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLL KLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLT ИЕМQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMVRT VDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 17 |

| | | |
|--|---|-----------|
| <p>HH1, ДНК hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1</p> | <p>ttctgaactccctgttcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctac tgcggccccctgcccgaagaactggatctgtacaagaacaactgtaccagtt cttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagcca gaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaa gctcgtgaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggca gctggcagtgggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcat cgagatgcagaagggcgactgcgccctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcacccccaacctacatctgtatgcagcggaccgtc acaagaccacacctgccccctgtcctgccccctgaactgctggcgggacc ctccgtgttctgttcccccaagccccaggacacctgatgatcagccgga ccccgaagtgacctgcgtgggtggacgtgtcccacgaggacctgaagt gaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaag cccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccg tgctgcaccaggactggtgaacggcaaaagagtacaagtgcaaagtctccaa caaggccctgctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggcca gccccgagagccccaggtgtacacactgccccagccgggacgagctgac caagaaccaggtgtccctgacctgctgtcaagggttctaccccagcgata tcgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagacca ccccctgtgctggacagcagcggctcattctctgtacagcaagctgacc gtggacaagtcccgtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgc acgaggecctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccg gcaaa</p> | <p>18</p> |
| <p>HH2, белок hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1</p> | <p>FLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQ FFDESKNWHYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLL KLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLT IEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMVRT VRSGGGSGGGSFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPK NWICYKNNCYQFFDESKNWHYESQASCMSQNASL LKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQ WEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIEN CSTPNTYICMVRTVDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL</p> | <p>19</p> |

| | | |
|--|--|-----------|
| | <p>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK</p> | |
| <p>HH2, ДНК hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1</p> | <p>ttcctgaactcctgttcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctac tgcggccccctgcccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagtt cttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagcca gaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaa gctcgtgaagtcctaccactggatgggcctggtgcacatccccaccaatggca gctggcagtgaggagcggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcat cgagatgcagaagggcgactgcgcctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcaccaccaacacctacatctgtatgcagcggaccgta gaagtggaggcgggtctggaggcggatcctttctgaatagcctgtttaaccag gaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgcccagaact ggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaagaattggt acgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctgaaggtgt acagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctaccactggat gggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggacggcag catcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcgactgc gcctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgcagcaccacca acacctacattgcatgcagcgtacggtgacaagaccacacctgccccct gtcctgccccctgaactgctgggcggaccctccgtgtcctgttcccccaaac ccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgcgtggtggt ggacgtgtcccacgaggacctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggc gtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacag cacctaccgggtggtgctcctgctgacctgctgcaccaggactggtgaac ggcaaagagtacaagtgcaaagtctccaacaaggcctgcctgccccatcg agaaaaccatcagcaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgtac aactgccccagccgggacgagctgaccaagaaccaggtgacctgacct gcctggtcaagggtcttaccaccagcgaatcgcctggaatgggagagcaa cggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcga cggctcattctctgtacagcaagctgacctggacaagtcccgggtggcagc agggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccacta</p> | <p>20</p> |

| | | |
|-----------------------------------|--|----|
| | caccagaagtcctgagcctgagccccgcaaa | |
| HH3, белок hFc1-hNKG2D(ак 78-216) | DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGFLNSLFNQEVQIPL TESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQA SCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLV HIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYA SSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV | 21 |
| HH3, ДНК hFc1-hNKG2D(ак 78-216) | gacaagaccacacctgtcctcctgtcctgccccgaactgctggcgaggacc tagcgtgtcctgttcccccaagccaaggacacctgatgatcagccgga ccccgaagtgacctgctgggtggatgtgtcccacgaggacctgaagt gaagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaag cccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtgtcctgctgaccg tgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaagggtgctcaa caaggccctgccagccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggcca gccccggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgac caagaaccagggtcctgacctgtctcgtgaagggttctaccctccgatat cgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagacca ccccctgtgctggacagcagcggctcattctctgtacagcaagctgaca gtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatg cacgaggecctgcacaaccactacaccagaagagcttaagcctgagccctg gttctctgaactcctgttcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagct actgcggccccctgccccagaactggatctgtacaagaacaactgtaccag ttcttcgacgagagcaagaattgttacgagagccagccagctgcatgagcc agaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaa gctcgtgaagtcctaccactggatggcctggtgcacatccccaccaatggca gtggcagtgaggagcggcagcctcctgagccccaacctgctgaccatcat cgagatgcagaagggcactgcgcctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcaccaccaacacctacatctgtatgcagcggaccgctc | 22 |

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>HH4, белок hFc1- hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)</p> | <p>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGFLNSLFNQEVQIPL TESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQA SCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLV HIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYA SSFKGYIENCSTPNTYICMQR TVRSGGSGGGSFL NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFF DESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLK LVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTII EMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQR TV</p> | <p>23</p> |
| <p>HH4, ДНК hFc1- hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)</p> | <p>gacaagaccacacctgtcctcctgtcctgccctgaactgctgggaggacc tagcgtgtcctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagccgga ccccgaagtgacctgctgggtggatgtgtcccacgaggacctgaagt gaagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaag cccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccg tgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtcaa caaggccctgccagccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggcca gccccggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgac caagaaccaggtgtcctgacctgtctcgtgaagggttctacctccgatat cgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagacca ccccctgtgctggacagcgacggctcattctcctgtacagcaagctgaca gtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatg cacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcttaagcctgagccctg gettctgaactcctgttcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagct actgcggccccctgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccag ttcttcgacgagagcaagaattggtacgagagccagggcagctgcatgagcc agaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaagaggaccaggatctgctgaa gctcgtgaagtctaccactggatggcctggtgcacatcccccaatggca</p> | <p>24</p> |

| | | |
|---|--|-----------|
| | <p>gctggcagtgggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcat cgagatgcagaagggcgactgcgccctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcacccccaacactacatctgtatgcagcggaccgtca gaagtggaggcggtctggaggcggatccttctgaatagcctgtttaaccag gaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggcccctgccccagaact ggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaagaattggt acgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctgaagggtg acagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtctaccactggat gggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggacggcag catcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcgactgc gccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgcagcaccccca acacctacatttgcatgcagcgtacggtt</p> | |
| <p>HH5, белок hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1[S239D, I332E]</p> | <p>FLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQ FFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLL KLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLT IEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMVRT VRSGGSGGGSFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPK NWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASL LKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQ WEDGSILSPNLLIEMQKGDICALYASSFKGYIEN CSTPNTYICMQRTVDKTHTCPPCPAPELLGGPDVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK</p> | <p>25</p> |

| | | |
|--|--|-----------|
| <p>HH5, ДНК hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 78- 216)-hFc1[S239D, I332E]</p> | <p>ttctgaactccctgttcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctac tgcggccccctgccccagaactggatctgtacaagaacaactgtaccagtt cttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagcca gaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgtgaa gctcgtgaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggca gctggcagtgggaggacggcagcatcctgagccccaacctgtgaccatcat cgagatgcagaagggcgactgcgcctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcacccccaacctacatctgtatgcagcggaccgta gaagtggaggcgggctggaggcggatcctttctgaatagcctgtttaaccag gaagtgcagatccccctgaccgagagctactcggccccctgccccagaact ggatctgtacaagaacaactgtaccagttcttcgacgagagcaagaattggt acgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgtgaaggtgt acagcaaagaggaccaggatctgtgaagctcgtgaagtcctaccactggat gggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgggaggacggcag catcctgagccccaacctgtgaccatcatcgagatgcagaagggcgactgc gccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgcagcaccccc acacctacattgcatgcagcgtacggttgacaagaccacacctgccccct gtctgccccctgaactgctggcggaccggacgtgttctgttcccccaag ccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgctggtgg tggactgtcccacgaggacctgaagtgaagtcaattggtacgtggacggc gtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagaggaacagtacaacag cacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaac ggcaaagagtacaagtgcaaagtctccaacaaggcctgcctgccccgaag agaaaaccatcagcaaggccaagggccagccccgcagccccaggtgtac acctgccccccagccgggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacct gcctggtcaagggttctaccccagcgatcgcctggaatgggagagcaa cggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcga cggctcatttctctgtacagcaagctgacctggacaagtcccgggtggcagc agggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggcctgcacaaccacta caccagaagtccctgagcctgagccccggcaaa</p> | <p>26</p> |
|--|--|-----------|

| | | |
|--|---|-----------|
| <p>HH7, белок hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>FLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQ FFDESKNWHYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLL KLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLT IEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRT VRSGGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICY KNNCYQFFDESKNWHYESQASCMSQNASLLKVYS KEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDG SILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPN TYICMQRVTVDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>27</p> |
| <p>HH7, ДНК hNKG2D(ак 78- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>ttctgaactccctgtcaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctac tgcggccccctgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagtt cttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagcca gaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaa gctcgtgaagtcctaccactggatggcctggtgcacatccccaccaatggca gctggcagtgggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcat cgagatgcagaagggcgactgcgcctgtacgccagcagcttcaagggcta catcgagaactgcagcacccecaacacctacatctgtatgcagcggaccgta gaagtggaggcgggtctggaggcggatccaaccaggaagtgcagatcccc tgaccgagagctactgcggccccctgccccagaactggatctgctacaagaa caactgctaccagttcttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggcca gctgcatgagccagaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggacc aggatctgctgaagctcgtgaagtcctaccactggatggcctggtgcacatc cccccaatggcagctggcagtgggaggacggcagcatcctgagccccaac ctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcgactgcgcctgtacgccagca gcttcaagggtacatcgagaactgcagcacccecaacacctacatttgcag cagcgtacggtgacaagaccacacctgccccctgtcctgccctgaact gctgggcggaccctcctgttctgttcccccaagcccaaggacacctga</p> | <p>28</p> |

| | | |
|--|--|-----------|
| | <p>tgatcagccggacccccgaagtgacctgcgtggtggacgtgtcccacga ggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaac gccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtg tccgtgctgaccgtgctgaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagt gcaaagtctccaacaaggccctgcctgccccatcgagaaaaccatcagcaa ggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgccccagcc gggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggtt ctaccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggccagccccgagaa caactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctcattcttctgta cagcaagctgaccgtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttcag ctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctg agcctgagccccggcaaa</p> | |
| <p>HH8, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRSG GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTVDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>29</p> |

| | | |
|--|---|-----------|
| <p>HH8, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaaggcg actgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcgagaactgtagcacc cccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtggaggcgggtctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacg ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatggcctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgagaaggcgactgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcga gaactgcagcaccaccaacacctacattgcatgcagcgtacggtgacaaga cccacacctgccccctgtctgccccctgaactgctgggcggaccctcctg ttctgttcccccaaaagccaaggacacctgatgatcagccggacccccga agtgacctgcgtggtggacgtgtcccacgaggacctgaagtgaagtca attggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagag aggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgca ccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtcaaaagtccaacaaggc cctgcctgccccatcgagaaaacctacagcaaggccaagggccagccccg cgagccccaggtgtacacactgccccagccgggacgagctgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggttctaccccagcgatcgcctg ggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccccc ctgtgctggacagcgcaggtcattcttctgtacagcaagctgaccgtggaca agtcccgtggcagcagggaacgtgtcagctgcagcgtgatgcacgagg ccctgcacaacctacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaaa</p> | <p>30</p> |
|--|---|-----------|

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>HH10, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1[S239D, I332E]</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRS GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTVDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPPEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>31</p> |
| <p>HH10, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1[S239D, I332E]</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgcccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccagccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccagatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaaggcgcg actgcgccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgcagcac ccccaacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtggaggcgggtct ggaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgc ggccccctgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttc gacgagagcaagaattggtacgagagccagccagctgcatgagccagaac gccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccagatctgctgaagctcg tgaagtcctaccactggatggcctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgcagaaggcgcactgcgccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcga gaactgcagcacccccaacctacattgcatgcagcgtacggtgacaaga ccccacactgccccctgtctgccccctgaactgctggcgggaccgacgt gttctgttcccccaagccaaggacacctgatgacagccggacccccg</p> | <p>32</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>aagtgacctgcgtggtggaggacgtgtcccacgaggacctgaagtgaagttc aattggtacgtggacggcgtggaagtgacacaacgccaagaccaagcccaga gaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgc accaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaagtctccaacaagg ccctgcctgccccgaagagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcccc gcgagccccaggtgtacacactgccccagccgggacgagctgaccaaga accaggtgtccctgacctgcctggtaagggttctaccccagcgatcgc gtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccctgtgctggacagcagcggtcattcttctgtacagcaagctgacctgga caagtcccgtggcagcagggaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgag gcctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaaa</p> | |
| <p>HH15_1, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-CH1-hFc1</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRSG GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLT</p> <p>IEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTR VASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>33</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>HH15_1, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-CH1-hFc1</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcg actgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcgagaactgtagcacc cccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtgaggcgggtctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacg ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgagaagggcgactgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcga gaactgcagcacccecaaacctacatttgcagcagctacgggtgctagca ccaagggccccagcgtgttccccctggcggccagcagcaagagcaccagcg gaggcacagccgccccctgggctgctggtgaaggacttccccgagccagt gaccgtgtcctggaacagcggagccctgacctccggcgtgcacacctcccc gccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgaccgtg cccagcagcagcctgggcaccagacctacatctgcaactgaaccacaag cccagcaacaccaaggtggacaagagagtgaggcccaagagctgcgacaa gaccacacctgccccctgtcctgccccctgaactgctgggaggaccctcc gtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccc cgaagtgacctgctggtggtggacgtgtcccacgaggacctgaagtgaag ttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacccaagaccaagcca gagaggaacagtacaacagcactaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgct gcaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtcaaaagtctccaaca ggcctgcctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcc ccgcgagccccagggtgtacacactgccccagccgggacgagctgaccaa gaaccagggtgcctgacctgctggtcaagggttctacccagcgatatcg ccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacc ccccctgtgctggacagcggctcatttctctgtacagcaagctgaccgtg gacaagtcccgtggcagcagggaacgtgtcagctgcagcgtgatgcagc</p> | <p>34</p> |
|---|---|-----------|

| | | |
|---|---|----|
| | aggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggca aa | |
| HH15_2, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hLC-каппа | NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWKYEQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRVRS GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWKYEQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTRVRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC | 35 |
| HH15_2, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hLC-каппа | aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcgccccctgcccc agaactggatctgtacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga agggttacagcaaagaggaccagatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcg actgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcgagaactgtagcacc cccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtggaggcgggtctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccctgccccagaactggatctgtacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacg ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccagatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggagacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgagaagggcgaactgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcga gaactgcagacccccaacctacattgcatgcagctacgggtcggacag | 36 |

| | | |
|--|--|-----------|
| | <p>tgccgctcctagcgtgttcatttccaccaagcgacgagcagctgaagtctg gcacagcctctgtcgtgtgcctgctgaacaacttctaccccagagaagccaag gtgcagtggagggtggacaatgcctgcagagcggcaatagccaagagagc gtgaccgagcaggacagcaaggatagcacatacagcctgagcagcaccctg actctgagcaaggccgactacgagaagcacaagtgtacgcctgccaagtga cacaccagggcctgtctagccctgtgaccaagagcttcaacagaggcgagtgc</p> | |
| <p>HH16_1, белок hNKG2D(ак 84- 216)-CH1-hFc1</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRVASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>37</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>HH16_1, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-CH1-hFc1</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgccc agaactggatctgtacaagaacaactgtaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgtgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaaggcg actgcgccctgtacgccagcgtcaagggtacatcgagaactgcagcac ccccaacactacattgcatgcagcgtacggttgctagcacaagggccca gcgtgtccccctggcgcccagcagcaagagcaccagcggcgccacagcc gccctgggctgcctggtgaaggactactccccgagccagtgaccgtgctctg gaacagcgggagccctgacctccggcgtgcacacctccccgccgtgctgcag agcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgaccgtgccagcagcagc ctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacacca aggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagaccacacctgc ccccctgtcctgccctgaactgctggggcggacctccgtgttctcttcccc ccaaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgc gtggtggtggacgtgtcccacgaggacctgaagtgaagtcaattggtacgt ggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagt acaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactg gtgaacggcaaagagtacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgcctgcc ccatcgagaaaacctcagcaaggccaagggccagccccgcgagccca ggtgtacacactgccccccagccgggacgagctgaccaagaaccaggtgtc cctgacctgctggtcaagggttctaccccagcgatcgcctggaatggg agagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctgg acagcgacggctcattctctgtacagcaagctgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcaca accactacaccagaagtccctgagcctgagccccggcaaa</p> | <p>38</p> |
| <p>HH16_2, белок hNKG2D(ак 84- 216)-hLC-каппа</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWEYEQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL</p> | <p>39</p> |

| | | |
|--|--|----|
| | TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C | |
| HH16_2, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-hLC-каппа | aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcgccccctgcccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcg actgccccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgcagcac ccccaacacctacattgcatgcagcgtacggttcggacagtggccgctcta gcgtgtcatcttccaccaagcgacgagcagctgaagctggcacagcctctg tcgtgtcctgctgaacaacttctaccccagagaagccaaggtgcagtggaag gtggacaatgcctgcagagcggcaatagccaagagagcgtgaccgagcag gacagcaaggatagcacatacagcctgagcagcaccctgactctgagcaag gccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgcacaccagggc ctgtctagccctgtgaccaagagcttcaacagagggcgagtgc | 40 |
| HH17, белок hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1 | NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK | 41 |
| HH17, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1 | aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcgccccctgcccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca | 42 |

| | | |
|--|--|-----------|
| | <p>ctggatggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagac ggcagcatcctgagcccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcg actgcgccctgtacgccagcagcttcaagggctacatcgagaactgcagcac cccaaacacctacatctgtatgcageggaccgtcgacaagaccacacctgc ccccctgtcctgccccctgaactgctgggcggaccctccgtgttctgttcccc ccaaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgc gtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgt ggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagt acaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactg gctgaacggcaaagagtacaagtgcaaagtccaacaaggccctgcctgcc cccatcgagaaaacctcagcaaggccaagggccagccccgcgagcccca ggtgtacacactgccccccagccgggacgagctgaccaagaaccagggtgc cctgacctgctggtcaagggttctaccccagcgatategccgtggaatggg agagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctgg acagcgacggctcatttctctgtacagcaagctgacctggacaagtccggg tggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcaca accactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaaa</p> | |
| <p>HH18, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1- hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRSG GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTVDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNQEVQIP LTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQ ASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL</p> | <p>43</p> |

| | | |
|--|---|-----------|
| | <p>VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDALY ASSFKGYIENCSTPNTYICMQR TVRSGGGSGGGSN QEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESKN WYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSY HWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQK GDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQR TV</p> | |
| <p>HH18, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1- hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcgccccctgcccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccagccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggaggac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggcg actgccccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcgagaactgtagcacc cccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtggaggcgggtctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccccctgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccagccagctgcatgagccagaacg ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgcagaagggcgactgccccctgtacgccagcagcttcaagggtacatcga gaactgcagcaccaccaacacctacatttgcagcagctacgggtgacaaga cccacacctgccccctgtcctgccccctgaactgctgggaggaccctccgtg ttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccga agtgacctgcgtgggtggacgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagtca attggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagag aggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgca ccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaagtctccaacaaggc cctgcctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccccg cgagccccaggtgtacacactgccccagccgggacgagctgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgctggtcaagggttctaccccagcgatcgcctg ggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccccc ctgtgctggacagcagcggctcatttctctgtacagcaagctgaccgtggaca agtccccgtggcagcagggcaacgtgtcagctgcagcgtgatgcacgagg</p> | <p>44</p> |

| | | |
|--|---|-----------|
| | <p>ccctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaaaaa ccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcgccccctgccc gaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagaga attggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgct ggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctac ggatgggcctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagc gcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaagggc ctgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcgagaactgtagcacc ccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtggaggcgggtct aggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactg ccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttctc cgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaac cagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctc aagtcctaccactggatgggcctggtgcacatccccaccaatggcagct gtgggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgag cagaagggcgactgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcgag actgcagcaccaccaacacctacattgcatgcagcgtacggt</p> | |
| <p>HH19, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-RSGGG- hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRVRS GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTRVRSGGGNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYK NNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSK EDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSI LSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTY ICMQRTRVRSGGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPK NWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASL LKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQ WEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIEN CSTPNTYICMQRTRVDTHTCPPCPAPPELLGGPSVF</p> | <p>45</p> |

| | | |
|--|--|-----------|
| | <p>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK</p> | |
| <p>HH19, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-RSGGG- hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)-hFc1</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgcccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaaggcg actgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcgagaactgtagcacc cccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtgaggcgggctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacg ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggagacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgagaagggcgactgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatga gaactgcagcaccaccaacacctacattgcatgcagcgcacggtaggtccg gcgggggaaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggcc cctgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacg agagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgcca gcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaa gtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagt gggaggacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgca gaaggcgactgcgccctgtacgccagcagctcaagggtacatcgagaac ttagcaccaccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtgagg cgggtctggaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagag ctactgcggccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctacc agttcttcgacgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgag</p> | <p>46</p> |

| | | |
|--|---|-----------|
| | <p>ccagaacgccagcctgctgaaggtgtacagcaagaggaccaggatctgctg aagctcgtgaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatgg cagctggcagtgaggagggacggcagcatcctgagcccaacctgctgaccatc atcgagatgcagaagggcgactgcgccctgtacgccagcagctcaagggt acatcgagaactgcagcaccaccaacacctacatttgcacagcgtacggtt gacaagaccacacctgccccctgtcctgccctgaactgctgggaggac cctccgtgtcctgttcccccaaaagcccaaggacaccctgatgatcagccgg acccccgaagtgacctgctggtggtggacgtgtccacgaggacctgaag tgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaa gcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacc gtgctgcaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtgcaaagtctcca acaaggcctgctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggcc agccccgcgagccccaggtgtacacactgccccagccgggacgagctga ccaagaaccaggtgtcctgacctgctggtcaagggttctaccaccagcgat atcgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagacc acccccctgtgctggacagcgacggctcattcttctgtacagcaagctgacc gtggacaagtcccgtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgc acgaggcctgcacaaccaactacaccagaagtcctgagcctgagccccg gcaa</p> | |
| <p>MM1, белок mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-mFc2</p> | <p>FQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCY QFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFL KLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQL TLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAVRSGGSGGGSFQPVLCNKEVPVSSREGYCGP CPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNS SLLKIYSKEEQDFLKLVKSYHWMGLVQIPANGSW QWEDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYT EDCANLNTYICMKRAVISAMVRSRPGPTIKPCPPC KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLF APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE</p> | <p>47</p> |

| | GLHNHHTTKSFSRTPGK | |
|---|--|----|
| MM1, ДНК mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-mFc2 | <pre> tttcaacctgtcctgtgtaacaaagaggttccagtgagttcaagagagggatact gcgggccatgtccgaataactggatctgccacaggaacaactgctatcagtttt caacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggcttctgtttgtctcagaactc cagtctgctgaagattfactcaaaggaggaacaggacttctcaactggtaaa gagctatcattggatgggactgggtcagatcccagccaatggctcttggcagtg ggaggatggaagctctctcagctacaaccagcttacctgggtgaaattccca aagggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaaagcctacacagaagattgcg ctaacctgaatacatacatttgcataaaaagggtgtcagaagtggaggcggg tctggaggcgggtctttcaacctgtcctgtgcaacaaagaagtgcccgtagt tccagagagggctactgtgggcatgtccaataattggatttccacagaaac aactgctaccagttcttaatgaggagaaaacttgaaccagtcacaagcctctt gtctgtcacaaaacagcagcttctgaaaatctacagcaaggaggagcagga ctttctgaagctggcaaatctatcactggatgggtctggtgcagatccccgcc aatggatcttggcaatgggaggacggctcttctctctataatcagctgacac tggtagaaatcccaaaggagctgtgcagtgtacgggagcagtttaaggcc tataccgaggattgcgcaatttgaacacttacatctgcataagaggccgtc atatcagctatgggtccgtcccaagaggaccaaccattaagccttgccegcc atgcaagtgccccgtccaaaccttctgggagggccgtctgtgttcattttctc ccaaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtc gtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagttggtttgtaaacaat gtagaggtgcacacggcacagacacagacctatgggaggattacaattcta ccctgcgggtcgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggt aaagaatttaagtcaaggtgaataataaggatctgcccgtcctattgagaga acgattagcaagcccaagggtccgtgcgcgaccccaagtctacgttctctct ccccagaagaggagatgacaaaaagcaggtcacctgacgtgtatggtga ctgattttatgcccgaagatatttactgtggaatggacaacaacggtaaaacag agctgaactacaagaatactgagcccgtgctggactccgacggctcttactttat gtatagcaagctgagagttgagaagaaaaattgggtagagagaaattcttactc atgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacaccacaagagttcagt agaactccaggtaaa </pre> | 48 |

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>MM2, белок mNKG2D(ак 94-232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94-232)-(G4S)2-mFc2</p> | <p>FQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCY QFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFL KLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQL TLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAVRSGGGSGGGSFQPVLCNKEVPVSSREGYCGP CPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNS SLLKIYSKEEQDFLKLVKSYHWMGLVQIPANGSW QW EDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDC ANLNTYICMKRAVGGGGSGGGGSISAMVRSRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p> | <p>49</p> |
| <p>MM2, ДНК mNKG2D(ак 94-232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94-232)-(G4S)2-mFc2</p> | <p>tttcaacctgtcctgtgaacaaagaggtccagtgagttcaagagagggatact gctggccatgtccgaataactggatctgccacaggaacaactgctatcagtttt caacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggttctctgttctcagaactc cagtctgctgaagattfactcaaaggaggaacaggacttctcaactggtaaa gagctatcattggatgggactgggtcagatcccagccaatggctcttggcagtg ggaggatggaagctctctcagctacaaccagcttacctgggtgaaattccca aagggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaaagcctacacagaagattgcg ctaacctgaatacatacatttgcataaaaagggtgtcagaagtggaggcggg tctggaggcgggtcttccaacctgtcctgtgcaacaaagaagtcccgtcagt tccagagagggtactgtggccatgtccaataattggatttcccacagaaac aactgctaccagttctttaatgaggagaaaacttgaaccagtcacaagcctctt gtctgcacaaaacagcagcttctgaaaatctacagcaaggaggagcagga ctttctgaagctggcaaatctatcactggatgggtctgtgcagatccccgcc aatggatcttggcaatgggaggacggctcttctctctataatcagctgacac tggtagaaatcccaaggagctgtgcagtgtacgggagcagtttaaggcc</p> | <p>50</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>tataccgaggattgcgcaaattgaacacttacatctgcatgaagaggccctc ggaggagggggctccggaggcggaggagcatatcagctatggccgctca ccaagaggaccaaccattaagccttgcggccatgcaagtgccccgctccaa acctctgggagggccgtctgtgttcattttcctccaaaatcaaagatgtgctg atgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtcgtggacgtgtcagaggatg accccgatgtgcagataagttggtttgaacaatgtagaggtgcacacggcac agacacagacctatgggaggattacaattctaccctgcgggtcgttagcgc ctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggtaaagaatttaagtgaaggt gaataataaggatctgcccgtcctattgagagaacgattagcaagcccaagg gtcctgtgcgcgcacccaagtctacgttcttctccccagaagaggagatg acaaaaagcaggtcaccctgacgtgtatggtgactgattttatgccgaagat attfacgtggaatggacaacaacggtaaacagagctgaactacaagaatac tgagcccgtgctggactccgacggctcttactttatgtatagcaagctgagagtt gagaagaaaaattgggtagagagaaattctactcatgttctgtgtacatgaag gactgcacaatcatcacaccacaagagtttcagtagaactccaggtaaa</p> | |
| <p>MM3, белок mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-(G4S)4-mFc2</p> | <p>FQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCY QFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFL KLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQL TLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAVRSGGSGGGSFQPVLCNKEVPVSSREGYCGP CPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNS SLLKIYSKEEQDFLKLVKSYHWMGLVQIPANGSW QW EDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDC ANLNTYICMKRAVGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ISAMVRSRPGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p> | <p>51</p> |

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>MM3, ДНК mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-(G4S)4-mFc2</p> | <p>tttcaacctgtcctgtgtaacaaagaggtccagtgagttcaagagaggatact gcgggccatgtccgaataactggatctgccacaggaacaactgctatcagtttt caacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggcttctgtttgtctcagaactc cagtctgctgaagatttactcaaggaggaacaggacttctcaactggtaaa gagctatcattggatgggactggttcagatcccagccaatggctcttggcagtg ggaggatggaagctctctcagctacaaccagcttacctgggtgaaattccca aagggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaaacctacacagaagattgcg ctaacctgaatacatacattgcatgaaaagggtgtcagaagtggagggcggg tctggagggcgggtctttccaacctgtcctgtgcaacaaagaagtcccgtcagt tccagagagggctactgtgggcatgtccaataattggattgccacagaac aactgctaccagttcttaatgaggagaaaacttgaaccagtcacaagcctctt gtctgtcacaaaacagcagcttgtgaaatctacagcaaggaggagcagga ctttctgaagctggtcaaatcttactggatgggtctggtgcagatccccgcc aatggatcttgcaatgggaggacggctcttctctctataatcagctgacac tggtagaaatcccaaaggagctgtgcagtgtacgggagcagtttaagcc tataccgaggattgcgcaatttgaacacttacatctgcatgaagagggccgtc ggaggagggggcagcggaggtgggggcagcgggggaggtgggtccgga ggcgggtgggagcatatcagctatggtccgctaccaagaggaccaaccatta agccttccccgccatgcaagtgccccgtccaaccttctgggagggccgtct gtgttcattttctcccaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctcaatc gtgacctgtgtgtcgtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagt tggtttgtaacaatgtagaggtgcacacggcacagacacagaccataggg aggattacaattctaccctgcgggtcgtttagcgcctgccgatccagcaccag gactggatgtcaggtaaagaatttaagtcaaggtgaataataaggatctgcc gtcctattgagagaacgattagcaagcccaagggtccgtgcgcgcacccc aagtctacgttctctccccagaagaggagatgacaaaaagcaggtcacc ctgacgtgtatggtgactgattttatgcccgaagatattacgtggaatggacia acaacggtaaacagagctgaactacaagaatactgagcccgtgtggactc cgacggctcttactttatglatagcaagctgagagttgagaagaaaaattgggta gagagaaattctactcatgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacac caciaagagttcagtagaactccaggtaaa</p> | <p>52</p> |
|---|--|-----------|

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>MM4, белок mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-(G4S)6-mFc2</p> | <p>FQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCY QFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFL KLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQL TLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAVRSGGGSGGGSFQPVLCNKEVPVSSREGYCGP CPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNS SLLKIYSKEEQDFLKLVKSYHWMGLVQIPANGSW QW EDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDC ANLNTYICMKRAVGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSISAMVRSRPGPTIKPCPPCKCPAPN LLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYF MYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTT KSFSRTPGK</p> | <p>53</p> |
|---|---|-----------|

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>MM4, ДНК mNKG2D(ак 94-232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94-232)-(G4S)6-mFc2</p> | <p>tttcaacctgtcctgtgtaacaaagaggtccagtgagttcaagagaggatact gcgggccatgtccgaataactggatctgccacaggaacaactgctatcagtttt caacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggcttctgtttgtctcagaactc cagtctgctgaagatttactcaaggaggaacaggacttctctcaactggtaaa gagctatcattggatgggactgggtcagatcccagccaatggctcttggcagtg ggaggatggaagctctctcagctacaaccagcttacctgggtgaaattccca aaggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaaacctacacagaagattgcg ctaacctgaatacatacattgcatgaaaagggtgtcagaagtggaggcggg tctggaggcgggtctttccaacctgtcctgtgcaacaaagaagtcccgtcagt tccagagagggctactgtgggccaatgtccaataattggattgccacagaac aactgctaccagttcttaatgaggagaaaacttgaaccagtcacaagcctctt gtctgtcacaaaacagcagcttgtgaaaatctacagcaaggaggagcagga ctttctgaagctggtcaaatcttactggatgggtctggtgcagatccccgcc aatggatcttgcaatgggaggacggctcttctctctataatcagctgacac tggtagaaatcccaaaggagctgtgcagtgtacgggagcagtttaagcc tataccgaggattgcgcaatttgaacacttacatctgcatgaagagggccgtc ggaggagggggctccggagggtgggggcagcgggggaggtgggtccgggtg ggggaggctctggcggagggtgggtctggaggcgggtgggagcatatcagcta tgggtccgtccaagaggaccaaccattaagccttccccgcatgcaagtgc cccgtccaaaccttctgggaggccgtctgtgttcattttctcccaaatcaa agatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtcgtggacgtgt cagaggatgaccccgatgtgcagataagttggttgtaacaatgtagaggtgc acacggcacagacacagacctagggaggattacaattctaccctgcgggt cgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggtaaagaattta agtgaaggtgaataataaggatctgcccgtcctattgagagaacgattagca agccaagggtccgtgcgcgacccaagtctacgttcttctccccagaa gaggagatgacaaaaagcaggtcaccctgacgtgatgggtgactgattttatg cccgaagatattfacgtggaatggacaacaacggtaaacagagctgaacta caagaatactgagcccgtgctggactccgacggctcttactttatgtatagcaag ctgagagttgagaagaaaaaftgggtagagagaaffcttactcatgttctgtgt acatgaaggactgcacaatcatcacaccacaaagagtttcagtagaactccag gtaaa</p> | <p>54</p> |
| <p>MM5, белок</p> | <p>ISAMVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP</p> | <p>55</p> |

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>mFc2- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>KIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKFQ PVLKNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCYQF FNEEKTWNQSQASCLSQNSSLKIYSKEEQDFLKL VKSYPHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQLTL VEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMKRA VRSGGSGGGSFQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCP NNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSL LKIYSKEEQDFLKL VKSYPHWMGLVQIPANGSWQ WEDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTE DCANLNTYICMKRAV</p> | |
| <p>MM5, ДНК mFc2- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>atatcagctatggtccgctcaccaagaggaccaaccattaagccttccccgcc atgcaagtccccgctccaaacctctgggagggccgtctgtgttcattttctc ccaaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtc gtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagttggtttgtaaacat gtagaggtgcacacggcacagacacagacctataggaggattacaattcta ccctgcgggtcgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggt aaagaatttaagtgaaggtgaataataaggatctccccgctcctattgagaga acgattagcaagcccaagggctccgtgcgcgaccccaagtctacgttctctc ccccagaagaggagatgacccaaaagcaggtcacctgacgtgtatggtga ctgattttatgcccgaagatattfacgtggaatggacaacaacggtaaacag agctgaactacaagaatactgagcccgctggactccgacggctcttactttat gtatagcaagctgagagttgagaagaaaaattgggtagagagaaattcttactc atgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacaccacaaagagttcagt agaactccaggtaaattcaacctgtcctgtgtaacaaagaggtccagtgagtt caagagagggatactgcccggccatgtccgaataactggatctgccacaggaa caactgctatcagttttcaacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggcttc ctgtttgtctcagaactccagtctgctgaagattfactcaaaggaggaacaggac ttctcaactggtaaaagactatcattggatgggactggttcagatcccagcca atggctcttggcagtgaggatggaagctctctcagctacaaccagcttacc</p> | <p>56</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>tggtggaaattcccaaaggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaagcct acacagaagattgcgctaacctgaatacatacatgcatgaaaagggtgtca gaagtggaggcgggtctggaggcgggtcttccaacctgtcctgtgcaaaaa gaagtgcccgctcagttccagagagggtactgtgggcatgtcccaataattg gattgccacagaacaactgtaccagttcttaagaggagaaaactggaa ccagtcacaagcctctgtctgcacaaaacagcagcttctgaaaatctacag caaggaggagcaggacttctgaagctggcaaatcttactggatgggtct ggtgcagatccccgcaatggatctggcaatggaggacggctcttctctc ctataatcagctgacactggtagaaatcccaaggagctgtgcagtgtagc ggagcagtttaaggcctataccgaggattgcgcaattgaacacttacatctg catgaagagggccgctc</p> | |
| <p>MM6, белок mFc2-(G4S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>ISAMVRSRGPPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKK NWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGG GGSGGGGSFQPVLNKEVPVSSREGYCGPCPNNW ICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLKIY SKEEQDFLKLKLSYHWMGLVQIPANGSWQWEDG SSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANL NTYICMKRAVRSGGSGGGSFQPVLNKEVPVSS REGYCGPCPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQ ASCLSQNSSLKIYSKEEQDFLKLKLSYHWMGLV QIPANGSWQWEDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVY GSSFKAYTEDCANLNTYICMKRAV</p> | <p>57</p> |

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>MM6, ДНК mFc2- (G4S)2- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>atatacagctatgggtccgctcaccaagaggaccaaccattaagccttgcccgcc atgcaagtgccccgctccaaacctctgggagggccgctgtgttcattttctc ccaaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtc gtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagttggtttgtaacaat gtagaggtgcacacggcacagacacagacccatagggaggattacaattcta ccctgcgggtcgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggt aaagaatttaagtgaaggtgaataataaggatctgcccgtcctattgagaga acgattagcaagcccaagggtccgtgcgcgaccccaagtctacgttctctc ccccagaagaggagatgacaaaaagcaggtcacctgacgtgatggta ctgattttatgcccgaagatattfacgtggaatggacaacaacggtaaacag agctgaactacaagaatactgagcccgtgctggactccgacggctcttactttat gtatagcaagctgagagttgagaagaaaaattgggtagagagaaattcttactc atgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacaccacaaagatttcagt agaactccaggtaaaggtggagggggctccggaggcgggtgggagctttcaa cctgtcctgttaacaaagaggttccagtgagttcaagagagggatactgcgg gccatgtccgaataactggatctgccacaggaacaactgctatcagttttcaac gaagaaaagacatggaaccagagtcaggcttctgtttgtctcagaactccagt ctgctgaagatttactcaaaggaggaacaggacttctcaaactggtaaagag ctatcattggatgggactggttcagatcccagccaatggctcttggcagtgggga ggatggaagctctctcagctacaaccagcttaccctggtggaattcccaaag gaagctgcgcagtgatggttcaagttcaaagcctacacagaagattgcgcta acctgaatacatacatttgcataaaaagggtgtcagaagtggaggcgggtct ggaggcgggtctttccaacctgtcctgtgcaacaaagaagtcccgtcagttcc agagagggctactgtgggcatgtccaataattggattggcacagaacaa ctgctaccagttctttaatgaggagaaaactggaaccagtcacaagcctctgt ctgtcaciaaacagcagcttctgaaaatctacagcaaggaggagcaggactt tctgaagctggtaaatcttactggtgggtctggtgcagatccccgccaat ggatcttggcaatgggaggacggcttctctctctataatcagctgacactgg tagaaatcccaaaggagctgtgcagtgacgggagcagtttaaggcctat accgaggattgcgcaatttgaacactfacatctgcatgaagagggccgctc</p> | <p>58</p> |
|---|--|-----------|

| | | |
|--|---|-----------|
| <p>MM7, белок mFc2-(G4S)4- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>ISAMVRSRGPPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGFQPVLCNKEVPVSSRE GYCGPCPNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQAS CLSQNSSLKIYSKEEQDFLKLKLSYHWMGLVQIP ANGSWQWEDGSSLSYNQLTLVEIPKGS CAVYGSS FKAYTEDCANLNTYICMKRAVRSGGGSGGGSFQP VLCNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCYQFF NEEKTWNQSQASCLSQNSSLKIYSKEEQDFLKLK LSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQLTLV EIPKGS CAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMKRAV</p> | <p>59</p> |
| <p>MM7, ДНК mFc2- (G4S)4- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>atatcagctatggtccgctcaccaagaggaccaaccattaagccttgcggcc atgcaagtgccccgctccaaaccttctgggagggccgtctgtgtcattttctc ccaaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtg gtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagttggtttgtaaacaat gtagaggtgcacacggcacagacacagaccataggaggattacaattcta ccctgcgggtcgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggt aaagaatftaagtgaaggtgaataataaggatctgcccgtcctattgagaga acgattagcaagcccaagggtccgtgcgcgaccccaagtctacgttctct ccccagaagaggagatgacaaaaagcaggtcacctgacgtgtatggtga ctgattttatgcccgaagatattacgtggaatggacaaacaacggtaaacag agctgaactacaagaatactgagcccgtgctggactccgacggctcttacttat gtatagcaagctgagagttgagaagaaaattgggtagagagaaattcttactc atgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacaccacaaagagttcagt agaactccaggtaaaggtggagggggcagcggaggtggggcagcggggg gaggtgggtccggaggcggggagctttcaacctgtcctgtgtaacaaaga ggttccagtgagttcaagagagggatactgcgggccatgtccgaataactgga tctgccacaggaacaactgctatcagttttcaacgaagaaaagacatggaacc</p> | <p>60</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>agagtcaggcttctgtttgtctcagaactccagctctgctgaagatttactcaag gaggaacaggacttctcaaactggtaaagagctatcattggatgggactggtt cagatcccagccaatggctcttggcagtgaggagatggaagctctctcagcta caaccagcttacctgggaaattcccaaaggaagctgcgcagtgatggttc aagtttcaaagcctacacagaagattgcgctaacctgaatacatatcattgcatg aaaagggctgtcagaagtggaggcgggtctggaggcgggtctttccaacctg tcctgtgcaacaaagaagtgcccgctcagttccagagagggtactgtgggcca tgtccaataattggattggccacagaaacaactgtaccagttctttaatgagga gaaaacttgaaccagtcacaagcctcttgtctgtcacaaaacagcagcttctg gaaaatctacagcaaggaggagcaggacttctgaagctggcaaatcttata ctggatgggtctgggtgcagatccccgccaatggatcttggcaatgggaggacg gctcttctctcctataatcagctgacactggtagaaatcccaaaggagctg tgagtgtagggagcagtttaaggcctataccgaggattgcgcaaatgaa cacttacatctgcatgaagagggccgctc</p> | |
| <p>MM8, белок mFc2-(G4S)6- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>ISAMVRSRGPPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGFQPVL CNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHRNNCYQFFNE EKTWNQSQASCLSQNSSLKIYSKEEQDFLKLKVS YHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSYNQLTLVEI PKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMKRAVRS GGSGGGGSGFQPVLNKEVPVSSREGYCGPCPNNW ICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLKIY SKEEQDFLKLKVSYHWMGLVQIPANGSWQWEDG SSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANL NTYICMKRAV</p> | <p>61</p> |

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>MM8, ДНК mFc2- (G4S)6- mNKG2D(ак 94- 232)-RS(G3S)2- mNKG2D(ак 94- 232)</p> | <p>atatacagctatgggtccgctcaccaagaggaccaaccattaagccttgcccgcc atgcaagtgccccgctccaaaccttctgggagggccgctctgtgttcattttctc ccaaaatcaaagatgtgctgatgattagcctgtctccaatcgtgacctgtgtgtc gtggacgtgtcagaggatgaccccgatgtgcagataagttggtttgtaacaat gtagaggtgcacacggcacagacacagacccaatagggaggattacaattcta ccctgcgggtcgttagcgcctgccgatccagcaccaggactggatgtcaggt aaagaatttaagtgaaggtgaataataaggatctgcccgtcctattgagaga acgattagcaagcccaagggtccgtgcgcgaccccaagtctacgttctctc ccccagaagaggagatgacaaaaagcaggtcacctgacgtgatggta ctgattttatgccgaagatattfacgtggaatggacaacaacggtaaacag agctgaactacaagaatactgagcccgctggactccgacggctcttactttat gtatagcaagctgagagttgagaagaaaaattgggtagagagaaattcttactc atgttctgtgtacatgaaggactgcacaatcatcacaccacaaagatttcagt agaactccaggtaaaggtggagggggctccggaggtgggggcagcgggg gaggtgggtccgggtgggggaggctctggcggaggtgggtctggagggcgt gggagctttcaacctgtctgtgaacaaagaggtccagtgagttcaagagag ggatactgcgggcatgtccgaataactgatctgccacaggaacaactgcta tcagttttcaacgaagaaaagacatggaaccagagtcaggttctctgtttgtct cagaactccagtctgctgaagattfactcaaaggaggaacaggacttctctaaa ctggtaaaagagctatcattggatgggactgggtcagatcccagccaatggctctt ggcagtgaggaggtggaagctctctcagctacaaccagcttaccctgggtgaa attcccaaaggaagctgcgcagtgatggttcaagttcaagcctacacagaa gattgcgctaacctgaatacatatcattgcatgaaaagggtgtcagaagtgga ggcgggtctggagggcgggtcttccaacctgtctgtgcaacaaagaagtgcc cgtcagttccagagagggtactgtgggcatgtccaataattggatttgcca cagaacaactgctaccagttcttfaatgaggagaaaacttgaaccagtcaca agcctctgtctgcacaaaacagcagcttctgaaaatctacagcaaggagga gcaggacttctgaagctggtcaaatcttactggatgggtctggtgcagatc cccccaatggatcttggcaatgggaggacggctcttctctctataatcagc tgacactggtagaaatcccaaggagctgtgcagtgacgggagcagtttt aaggcctataccgaggattgcgcaatttgaacacttacatctgcatgaagagg gccgtc</p> | <p>62</p> |
|---|---|-----------|

| | | |
|--|---|----|
| <p>Иллюстративный гетерокомплекс IL-15/IL-15Ra</p> | <p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLILAN NSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYIC NSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEI SSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQ G</p> | 67 |
| <p>Fc белка HH1 hFc1 DANAPA</p> | <p>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | 68 |
| <p>HH1, белок hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)- hFc1_DANAPA</p> | <p>NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK NWKYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQ KGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRVRS GGSGGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWKYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQ DLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSP NLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTRVDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | 69 |

| | | |
|---|--|-----------|
| <p>HH11, ДНК hNKG2D(ак 84- 216)-RS(G3S)2- hNKG2D(ак 84- 216)- hFc1_DANAPA</p> | <p>aaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcggccccctgccc agaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcgacgagagcaag aattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaacgccagcctgctga aggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgtgaagtcctacca ctggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctggcagtgaggagac ggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgagatgcagaaggcg actgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcgagaactgtagcacc ccaacacctacatctgtatgcagcggaccgtcagaagtgaggcggtctg gaggcggatccaaccaggaagtgcagatccccctgaccgagagctactgcg gccccgccccagaactggatctgctacaagaacaactgctaccagttcttcg acgagagcaagaattggtacgagagccaggccagctgcatgagccagaac ccagcctgctgaaggtgtacagcaaagaggaccaggatctgctgaagctcgt gaagtcctaccactggatgggctggtgcacatccccaccaatggcagctgg cagtgaggagacggcagcatcctgagccccaacctgctgaccatcatcgaga tgcaagaaggcgactgcgccctgtacgccagcgttcaagggtacatcga gaactgcagcaccaccaacacctacattgcatgcagcgtacggtgacaaga cccacacctgccctcctgtccagccccctgaactgctgggaggccctagcgtg ttctgttcccccaaaagccaaggacacctgatgatcagccggaccgccga agtgacctgtgtggtggcctgtctcacaggacctgaagtgaagtttaa ttggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagaga ggaacagtacgccagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacagtgctgcac caggactggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggcc ctggccgctccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccccgc gaacccaggtgtacacactgccccctagcaggacgagctgaccaagaac caggtgtccctgacctgcctcgtgaagggttctaccctccgatatgccctg gaatgggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccct gtgctggactccgacggctcattcttctgtacagcaagctgaccgtggacaag tcccgtggcagcagggcaacgtgttcagctgctccgtgatgcagagggcc tgcaaacactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaaa</p> | <p>70</p> |
|---|--|-----------|

[0540] Эквиваленты

[0541] Раскрытия всех и каждого патента, заявки на патент и публикации, цитированных в настоящем документе включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Несмотря на то, что настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные аспекты, очевидно, что другие аспекты и видоизменения настоящего изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной

области без отступления от фактической сущности и объема настоящего изобретения. Предполагается, что прилагаемую формулу изобретения следует истолковывать как включающую все такие аспекты и эквивалентные видоизменения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Димерный белок, содержащий два мономера, где каждый мономер содержит
 - (1) первый пептид NKG2D или его вариант;
 - (2) второй пептид NKG2D или его вариант;
 - (3) первый пептидный линкер, соединяющий указанный первый пептид NKG2D или его вариант и указанный второй пептид NKG2D или его вариант; и
 - (4) область, представляющую собой кристаллизующийся фрагмент (Fc-область) иммуноглобулина (Ig).
2. Димерный белок по п. 1, где указанный первый пептид NKG2D или его вариант и указанный второй пептид NKG2D или его вариант характеризуются идентичными аминокислотными последовательностями.
3. Димерный белок по п. 1, где указанный первый пептид NKG2D или его вариант и указанный второй пептид NKG2D или его вариант характеризуются отличными аминокислотными последовательностями.
4. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный первый пептид NKG2D или его вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.
5. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный первый пептид NKG2D или его вариант содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.
6. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный второй пептид NKG2D или его вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.
7. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный второй пептид NKG2D или его вариант содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.
8. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный первый пептидный линкер представляет собой глицин-сериновый пептидный линкер.
9. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный пептидный линкер представлен формулой $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 9), где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5.
10. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный пептидный линкер представляет собой $(GGGS)_2$ (SEQ ID NO: 10).
11. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанная Fc-область предусматривает Fc-область иммуноглобулина G (IgG) человека.
12. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанная Fc-область предусматривает Fc-область IgG1 человека.
13. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанная Fc-область содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.
14. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанная Fc-область

содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, 6, 63, 64, 65 или 68.

15. Димерный белок по любому из пп. 1-14, где указанный мономер содержит, в направлении от N-конца к C-концу, указанный первый пептид NKG2D или его вариант, указанный первый пептидный линкер, указанный второй пептид NKG2D или его вариант и указанную Fc-область.

16. Димерный белок по п. 15, где указанный второй пептид NKG2D или его вариант слит непосредственно с указанной Fc-областью без пептидного линкера.

17. Димерный белок по п. 15, где указанный второй пептид NKG2D или его вариант присоединен к указанной Fc-области посредством второго пептидного линкера.

18. Димерный белок по любому из пп. 1-14, где указанный мономер содержит, в направлении от N-конца к C-концу, указанную Fc-область, указанный первый пептид NKG2D или его вариант, указанный первый пептидный линкер и указанный второй пептид NKG2D или его вариант.

19. Димерный белок по п. 18, где указанная Fc-область слита непосредственно с указанным первым пептидом NKG2D или его вариантом без пептидного линкера.

20. Димерный белок по п. 19, где указанная Fc-область присоединена к указанному первому пептиду NKG2D или его варианту посредством второго пептидного линкера.

21. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный мономер дополнительно содержит один или два дополнительных пептида NKG2D или их варианта.

22. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный мономер содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 и 69.

23. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный мономер содержит аминокислотную последовательность с любым из SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 и 69.

24. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 70.

25. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанный мономер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из любой из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 70.

26. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанные два мономера соединены ковалентной связью.

27. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, где указанные два мономера соединены посредством мостиковой связи Cys-Cys.

28. Димерный белок по любому из предыдущих пунктов, дополнительно

содержащий фрагмент, представляющий собой лекарственное средство.

29. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 70.

30. Вектор, содержащий указанный выделенный полинуклеотид по п. 29.

31. Композиция, содержащая димерный белок по любому из пп. 1-28, полинуклеотид по п. 29 или вектор по п. 30.

32. Композиция по п. 31, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

33. Клетка, содержащая димерный белок по любому из пп. 1-28, полинуклеотид по п. 29, вектор по п. 30 или композицию по любому из пп. 31-32.

34. Клетка по п. 33, где указанная клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).

35. Клетка по любому из пп. 33-34, где указанная клетка представляет собой модифицированную клетку СНО.

36. Клетка по любому из пп. 33-35, где указанная модифицированная клетка СНО содержит инактивированный ген матриптазы или нокаутированный ген матриптазы.

37. Димерный белок по любому из пп. 1-28, полученный с помощью клетки по любому из пп. 33-36.

38. Димерный белок по любому из пп. 1-28, полученный с помощью клетки СНО.

39. Димерный белок по п. 38, где указанная клетка СНО представляет собой модифицированную клетку СНО.

40. Димерный белок по п. 39, где указанная модифицированная клетка СНО содержит инактивированный ген матриптазы или нокаутированный ген матриптазы.

41. Способ лечения заболевания, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, димерного белка по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40 или композиции по любому из пп. 31-32.

42. Способ по п. 41, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

43. Способ по п. 41, где указанное заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

44. Способ по п. 43, где указанный рак представляет собой рак, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

45. Способ по любому из пп. 41-44, где указанный субъект характеризуется наличием рака, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

46. Способ по п. 45, где рак, при котором экспрессируется лиганд, представляет собой рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак почки, карциному носоглотки (NPC), рак предстательной железы, меланому, рак из плазматических клеток, лейкоз, лимфому, глиому или нейробластому.

47. Способ по п. 46, где указанный лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

48. Способ по любому из пп. 41-47, дополнительно включающий лечение субъекта с помощью дополнительной противораковой терапии или противоракового средства.

49. Способ по п. 48, где указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, генную терапию, ДНК-терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, адъювантную терапию или иммунотерапию.

50. Способ по любому из пп. 48-49, где указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой химиотерапию, которая обеспечивает повреждение ДНК.

51. Способ по любому из пп. 41-50, где указанный лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

52. Способ по п. 41, где указанное аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, колит, целиакию, рассеянный склероз, очаговую алопецию, диабет 1 типа, хроническую обструктивную болезнь легких, атеросклероз или метаболический синдром, ассоциированный с диабетом 2 типа.

53. Способ диагностирования заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D, при этом способ включает

(1) получение биологического образца от субъекта, характеризующегося наличием заболевания, при котором экспрессируется лиганд NKG2D;

(2) приведение указанного биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим димерный белок по любому из пп. 1-28 и п. 37 или композицию по любому из пп. 31-32; и

(3) определение связывания указанного лиганда NKG2D с указанным связывающим реагентом; где связывание указанного лиганда NKG2D с указанным связывающим реагентом указывает на диагноз заболевания, при котором экспрессируется указанный лиганд NKG2D, у указанного субъекта.

54. Способ по п. 53, где указанный лиганд NKG2D представляет собой MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 или ULBP6.

55. Димерный белок по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40, полинуклеотид по п. 29, вектор по п. 30 или композиция по любому из пп. 31-32 для применения в качестве лекарственного препарата.

56. Димерный белок по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40, полинуклеотид по п. 29, вектор по п. 30 или композиция по любому из пп. 31-32 для применения в изготовлении лекарственного препарата.

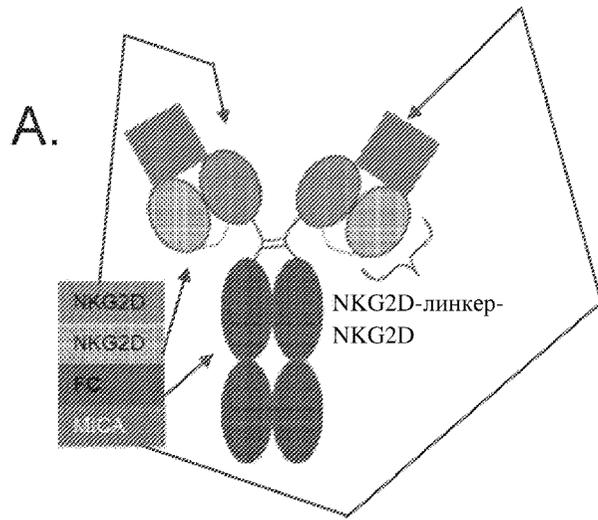
57. Димерный белок по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40, полинуклеотид по п. 29, вектор по п. 30 или композиция по любому из пп. 31-32 для применения в лечении заболевания.

58. Димерный белок по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40, полинуклеотид по п. 29,

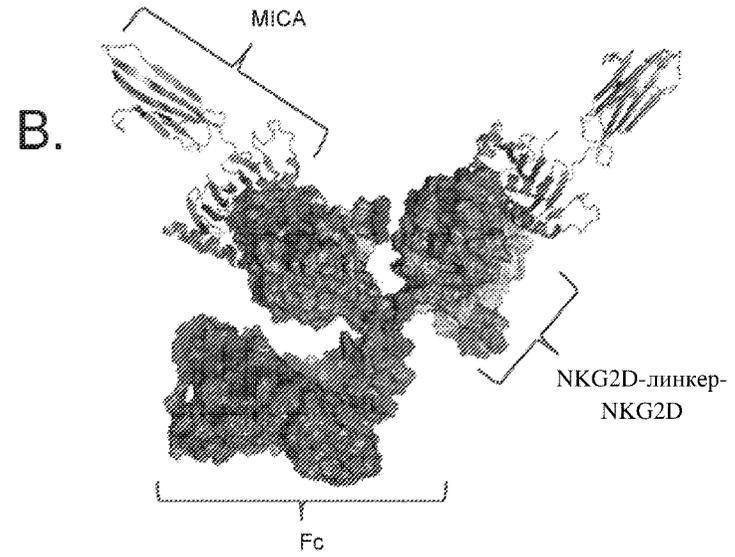
вектор по п. 30 или композиция по любому из пп. 31-32 для применения в лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется лиганд NKG2D.

59. Димерный белок по любому из пп. 1-28 и пп. 37-40, полинуклеотид по п. 29, вектор по п. 30 или композиция по любому из пп. 31-32 для применения в лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

По доверенности

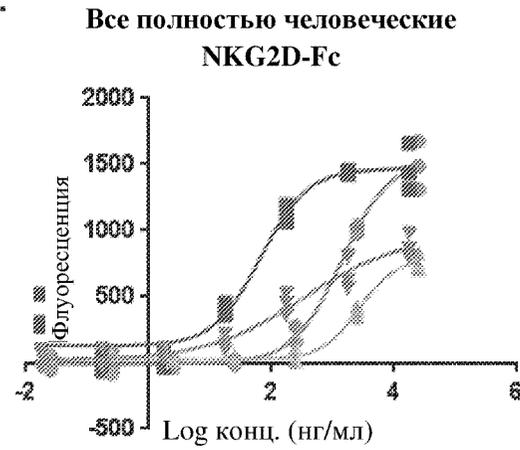


Фиг. 1



Фиг. 2

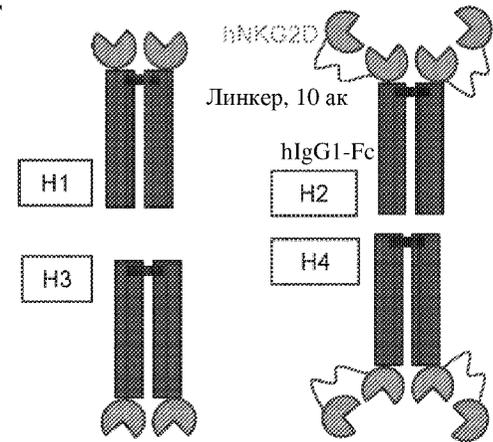
A.



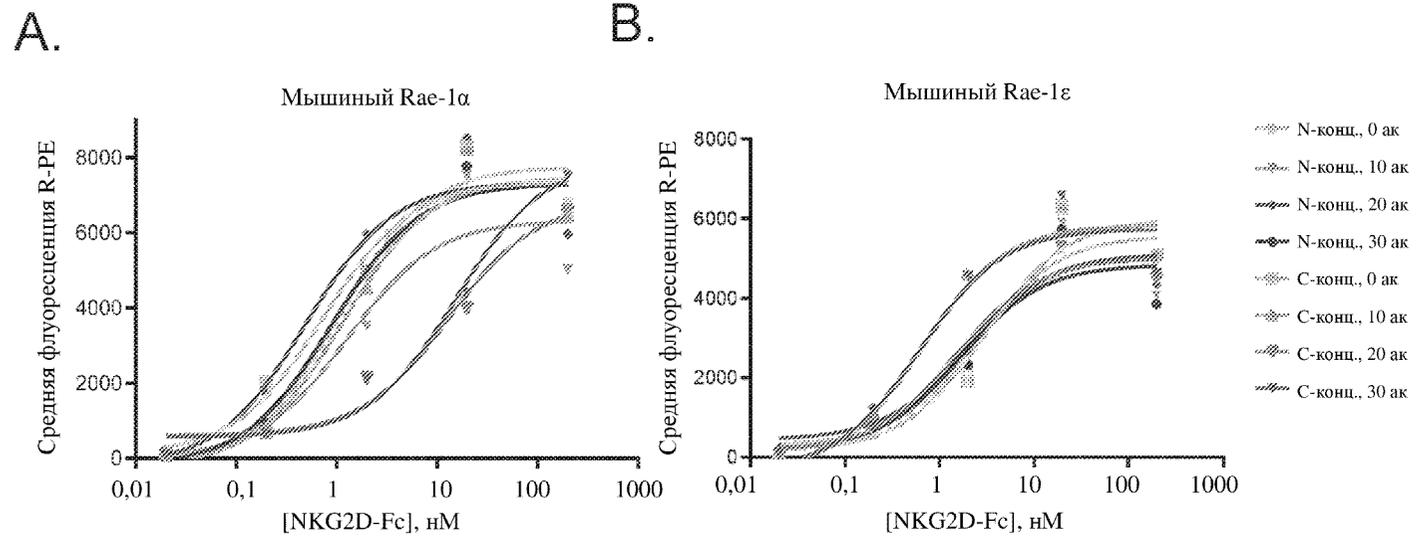
- Планшет 2 – H4
- Планшет 2 – H3
- Планшет 1 – H2
- Планшет 1 – H1

| | EC50 (нг/мл) |
|----------------|--------------|
| Планшет 1 – H1 | 140,3 |
| Планшет 1 – H2 | 66,53 |
| Планшет 2 – H3 | 264,6 |
| Планшет 2 – H4 | 334,6 |

B.

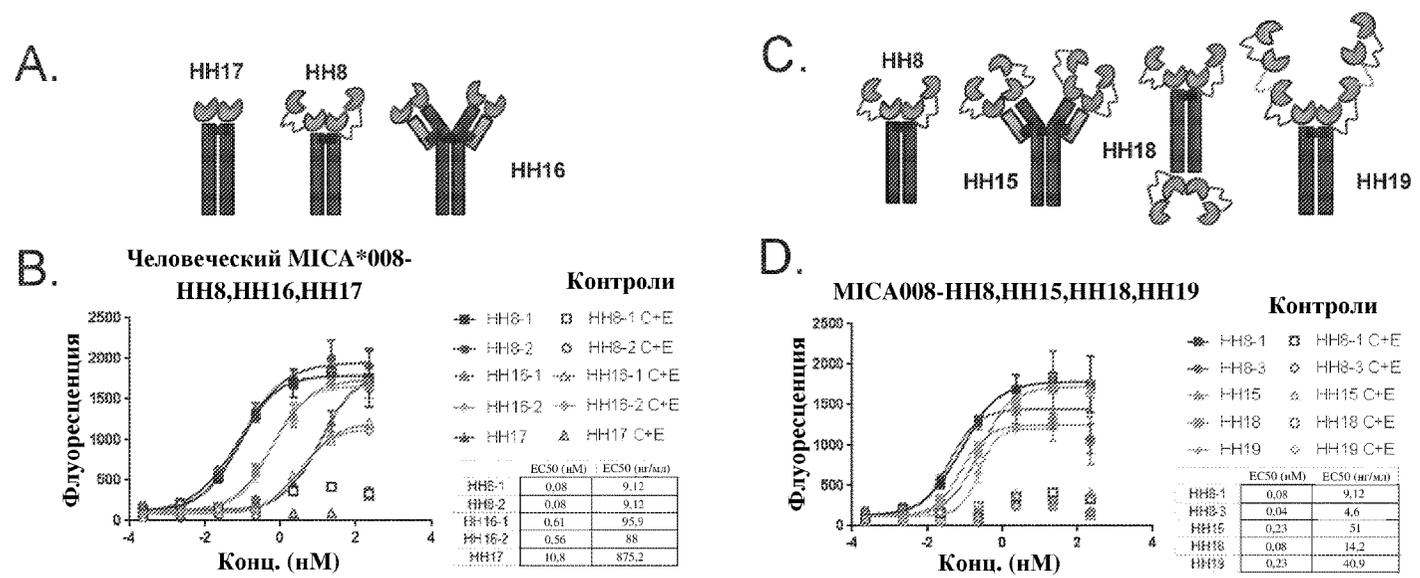


Фиг. 3

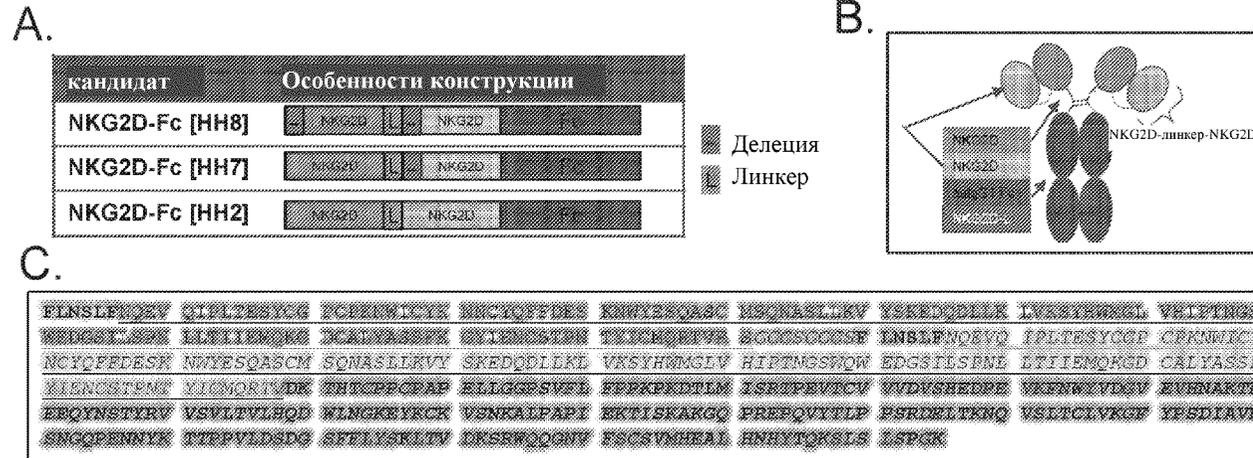


| Конструкция | N-конт., 0 ак | N-конт., 10 ак | N-конт., 20 ак | N-конт., 30 ак | C-конт., 0 ак | C-конт., 10 ак | C-конт., 20 ак | C-конт., 30 ак |
|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Rae-1α | 1,053 | 1,268 | 0,4954 | 0,8939 | 0,7384 | 1,154 | 13,00 | 15,58 |
| Rae-1ε | 2,562 | 1,868 | 1,990 | 1,654 | 3,022 | 0,6680 | 1,497 | 0,6240 |

Фиг. 4

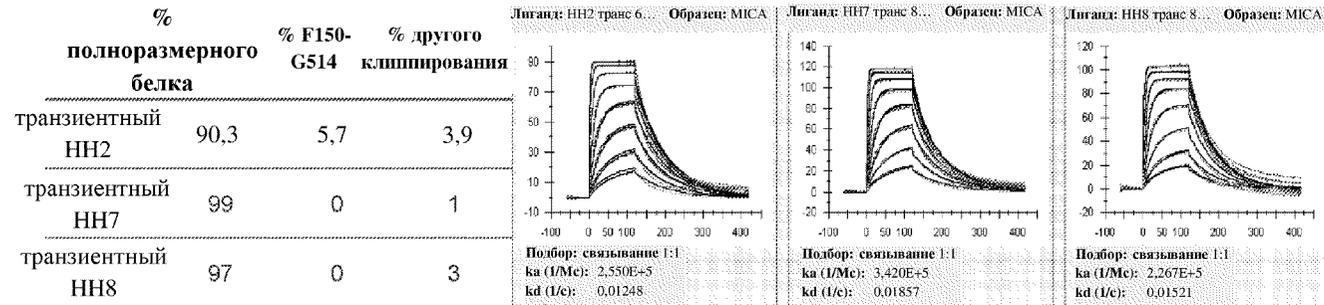


Фиг. 5



Жирный шрифт: делеция; подчеркивание: NKG2D; курсив: линкер; курсив, подчеркивание: NKG2D; жирный шрифт, курсив: Fc huIgG1

D.



Фиг. 6

HH8

hNKG2D(aa84-216)-RS(G3S)2-hNKG2D(aa84-216)-hFc1 (HH8)

NKG2D

Шарнир

CH2

CH3

Сайт N-гликозилирования

Сайт изомеризации DG

Линкер RS(G₃S)₂

NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCM
 SQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSSIL
 SPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRSGGGS
GGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQ
 ASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWE
DGSSILSPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVDK
 THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 7

NKG2D

Шарнир

CH2

CH3

Сайт N-гликозилирования

Сайт изомеризации DG

Линкер RS(G₃S)₂

HH10

hNKG2D(aa84-216)-RS(G3S)2-hNKG2D(aa84-216)-hFc1[S239D,I332E] (HH10)

NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCM
 SQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSSIL
 SPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRRSGGGS
GGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQ
 ASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWE
DGSILSPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVDK
THTCPPCPAPELLGGPQVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 8

HN8-afuco

а-фукозилированный hNKГ2D(aa84-216)-RS(G3S)2-hNKГ2D(aa84-216)-hFc1

NKG2D

Шарнир

CH2

CH3

Сайт N-гликозилирования

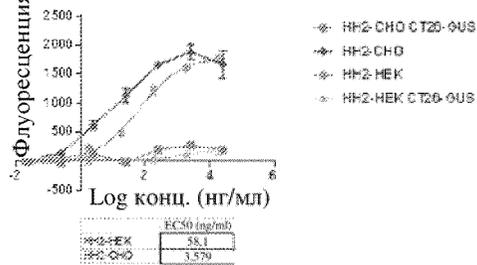
Сайт изомеризации DG

Линкер RS(G₃S)₂

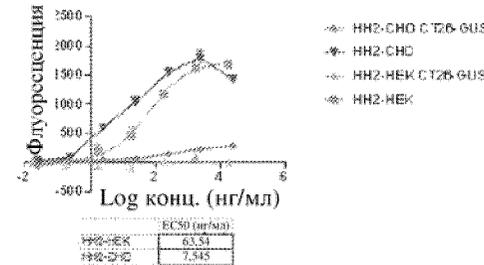
NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCM
SQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSSIL
SPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRSGGGGS
GGGSNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQ
ASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWE
DGSSILSPNLLTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTRVDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 9

A. Полный 2xNKG2D-Fc HH2 человека из НЕК-Т и CHO CT26-huMICA'008

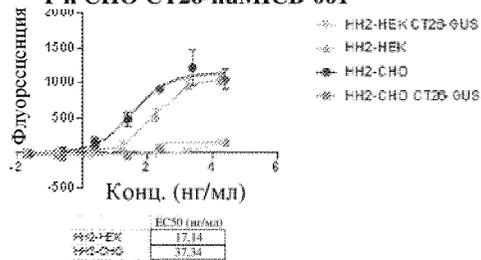


B. Полный 2xNKG2D-Fc HH2 человека из НЕК-Т и CHO CT26-huMICA'001

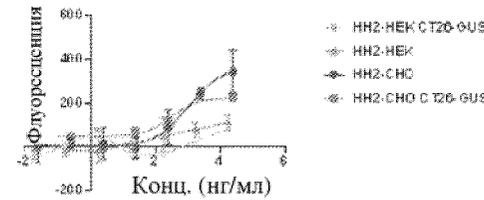


GraphPad Prism 7 – log(агонист) в сравнении с ответом – откос с переменным заложением (четыре параметра)

C. Полный 2xNKG2D-Fc HH2 человека из НЕК-Т и CHO CT26-huM1СВ'001



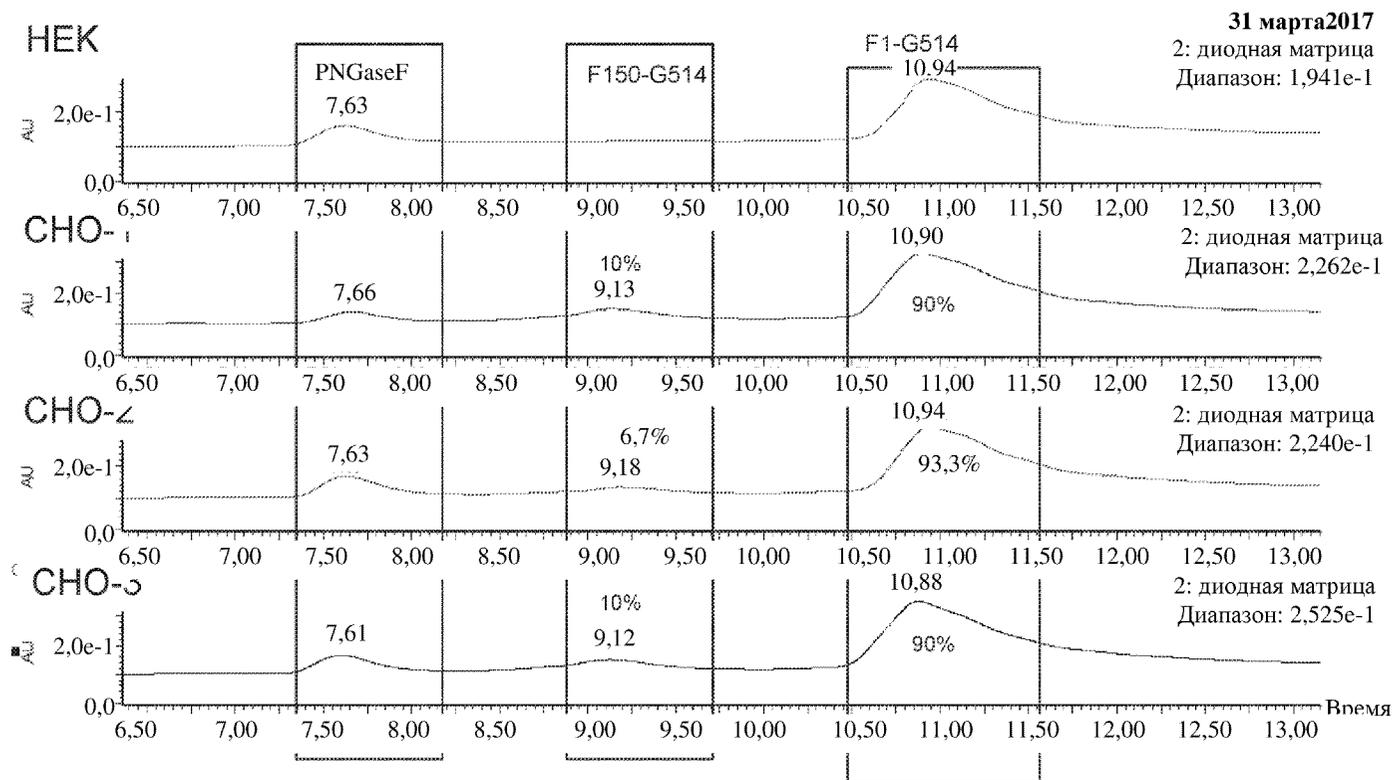
D. Полный 2xNKG2D-Fc HH2 человека из НЕК-Т и CHO CT26-суM1СВ05



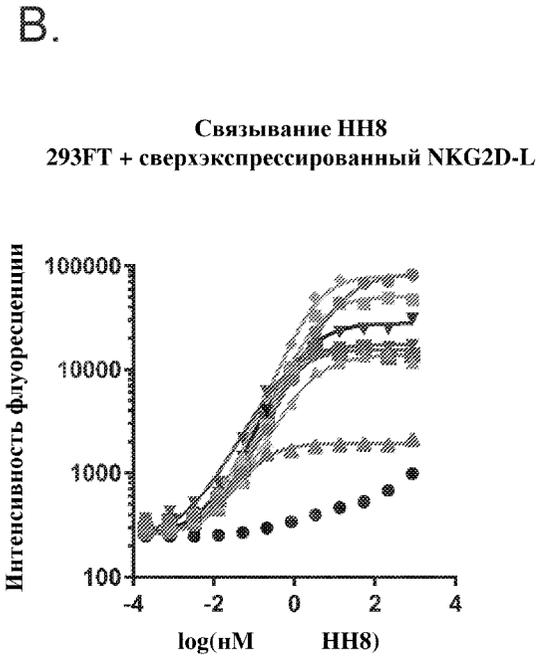
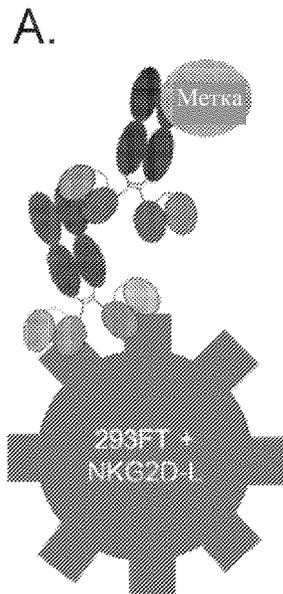
E. ADCC
НЕК v. CHO
линия клеток-продуцентов



Фиг. 10



Фиг. 11

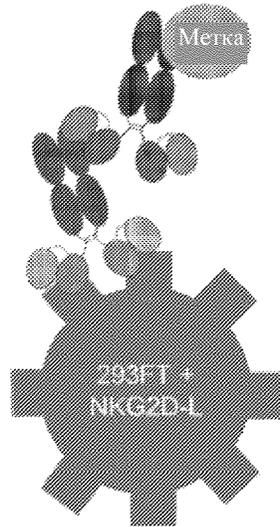


| | EC50 (нМ) |
|------------|-----------|
| huMICA*001 | 12,97 |
| huMICA*008 | 3,28 |
| huMICB*001 | 2,02 |
| huULBP1 | 0,60 |
| huULBP2 | 3,04 |
| huULBP3 | 1,76 |
| huULBP4 | 0,76 |
| huULBP5 | 0,09 |
| Имитация | |

Выявление 293FT + сверхэкспрессированный NKG2D-L
Связывание NKG2D-Fc с флуоресцентно меченным вторичным антителом

Фиг. 12

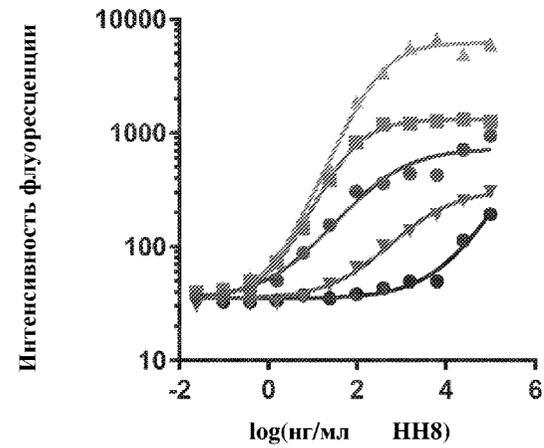
A.



Выявление 293FT + сверхэкспрессированный NKG2D-L.
Связывание NKG2D-Fc с флуоресцентно меченым вторичным антителом

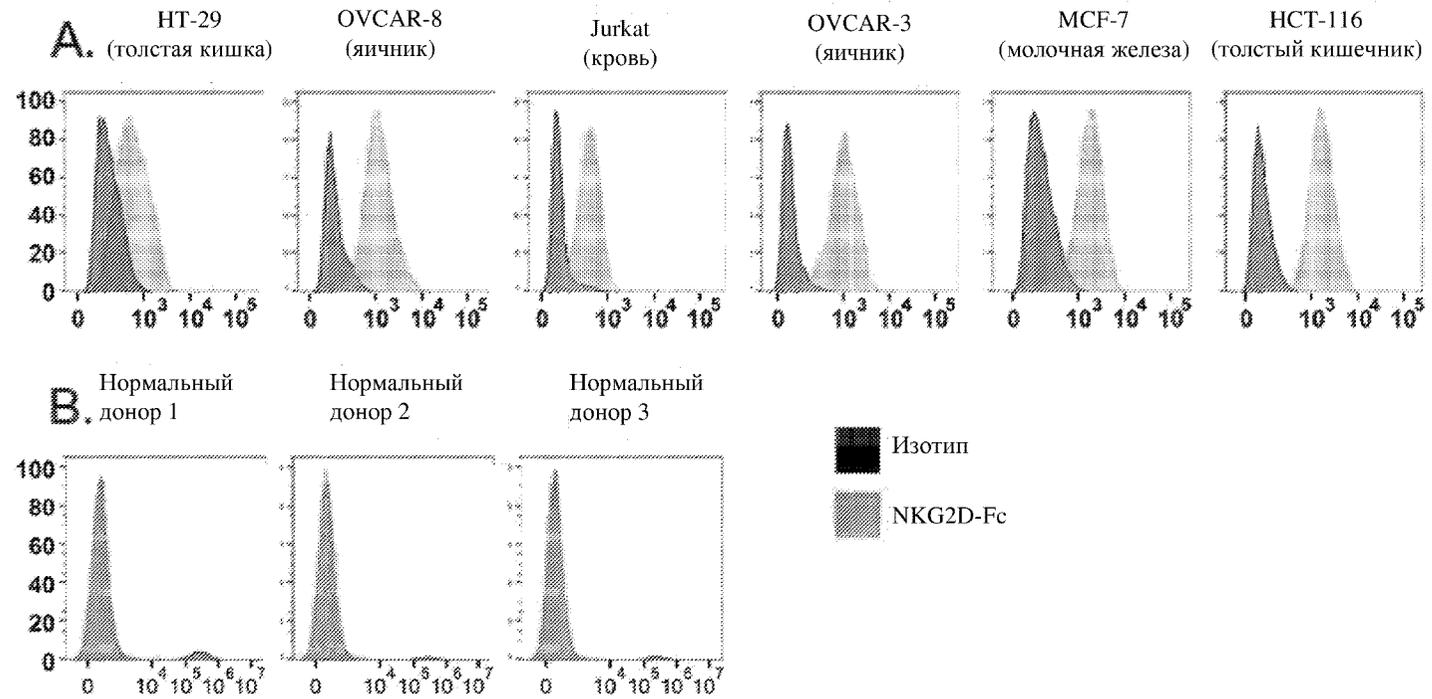
B.

Связывание НН8
293FT + сверхэкспрессированный NKG2D-L



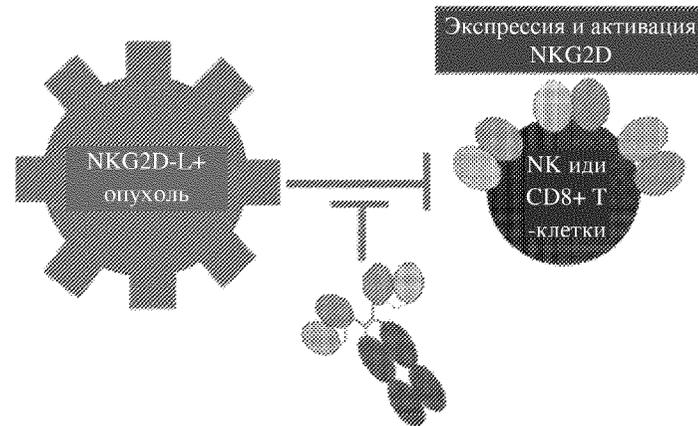
| | EC50 (нг/мл) | EC50 (нМ) |
|-------------|--------------|-----------|
| ● cyULBP1 | 359,124 | 3,09 |
| ▨ cyULBP2 | 68,803 | 0,59 |
| △ cyMICA*08 | 297,747 | 2,57 |
| ▨ cyMICB*05 | 3048,345 | 26,28 |
| ● Имитация | 2,186e+009 | |

Фиг. 13



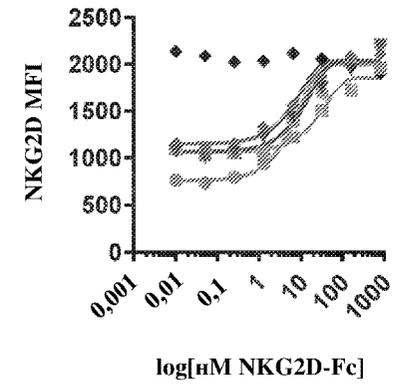
Фиг. 14

A.



B.

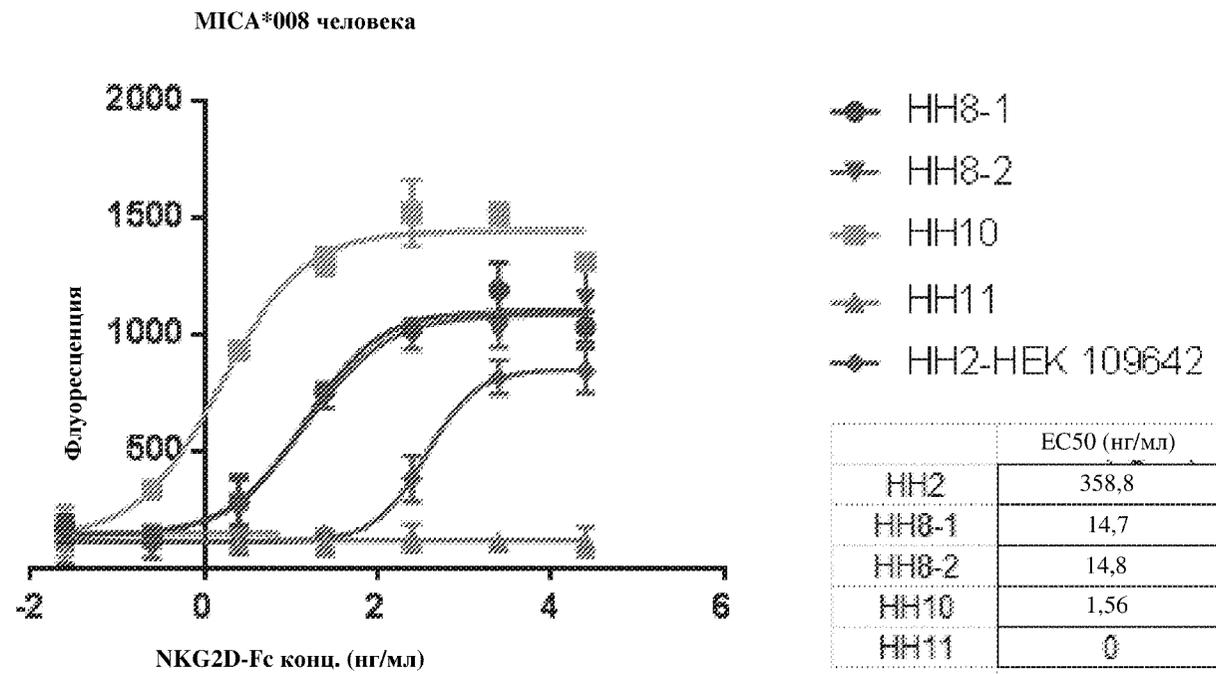
Первичные НК-клетки человека
Восстановление *in vitro* NKG2D
Совместно культивируемая опухоль



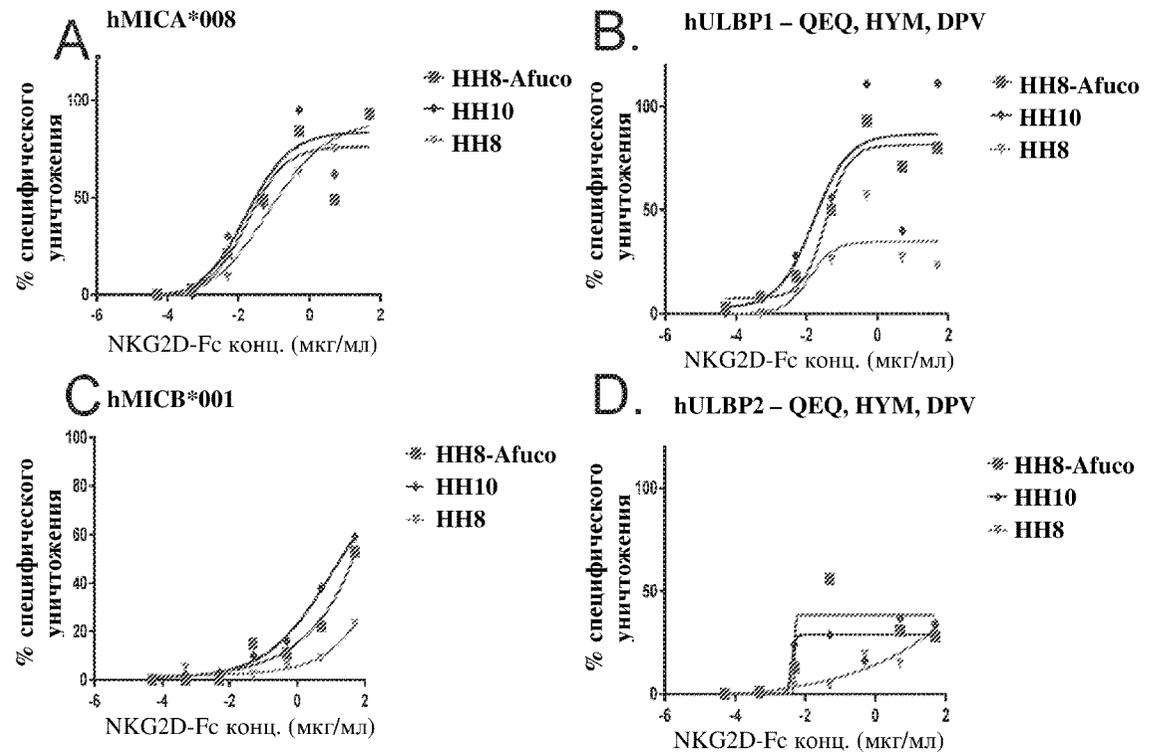
Экспрессия опухоли NKG2D-L

- ◆ Без NKG2D-L
- ▨ huMICA*001+ULBP2
- ▨ huMIB*001
- ▨ huULBP1
- ▨ huULBP2

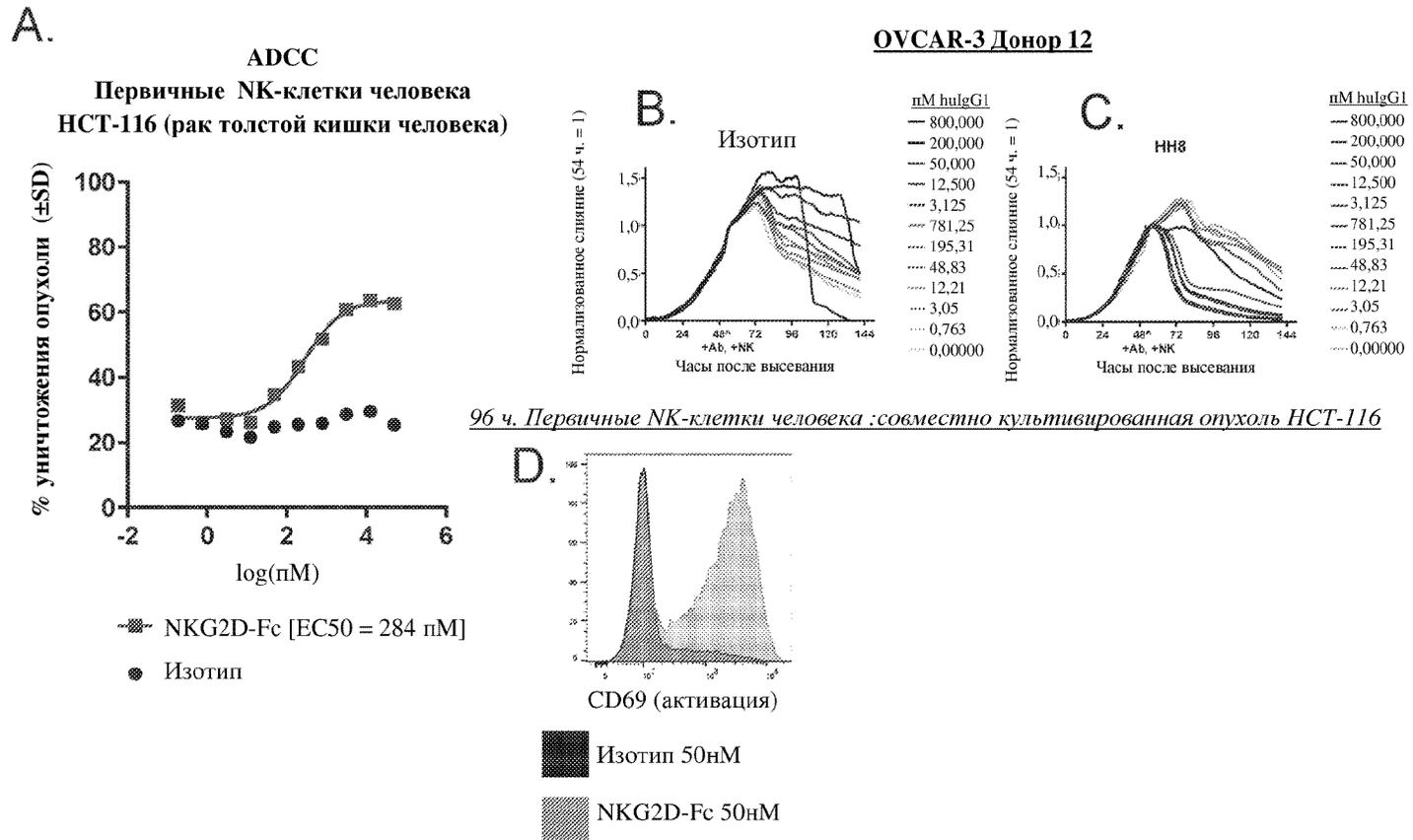
Фиг. 15



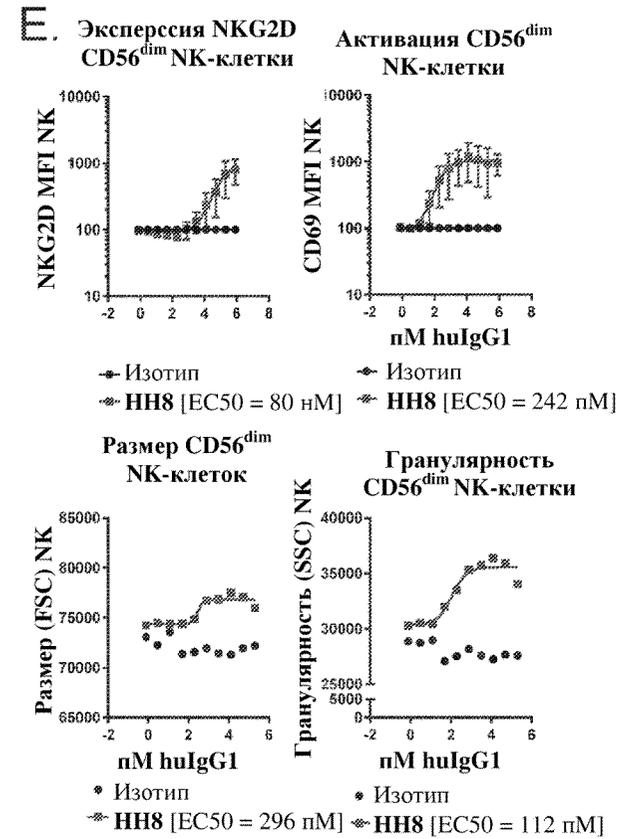
Фиг. 16



Фиг. 17

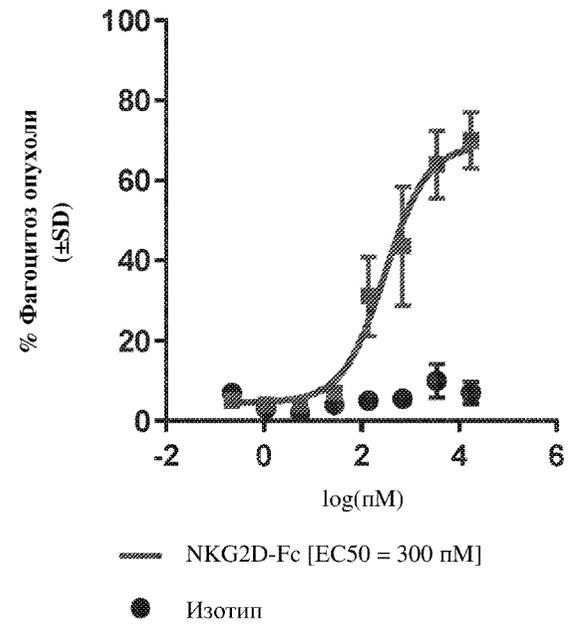


Фиг. 17-продолжение

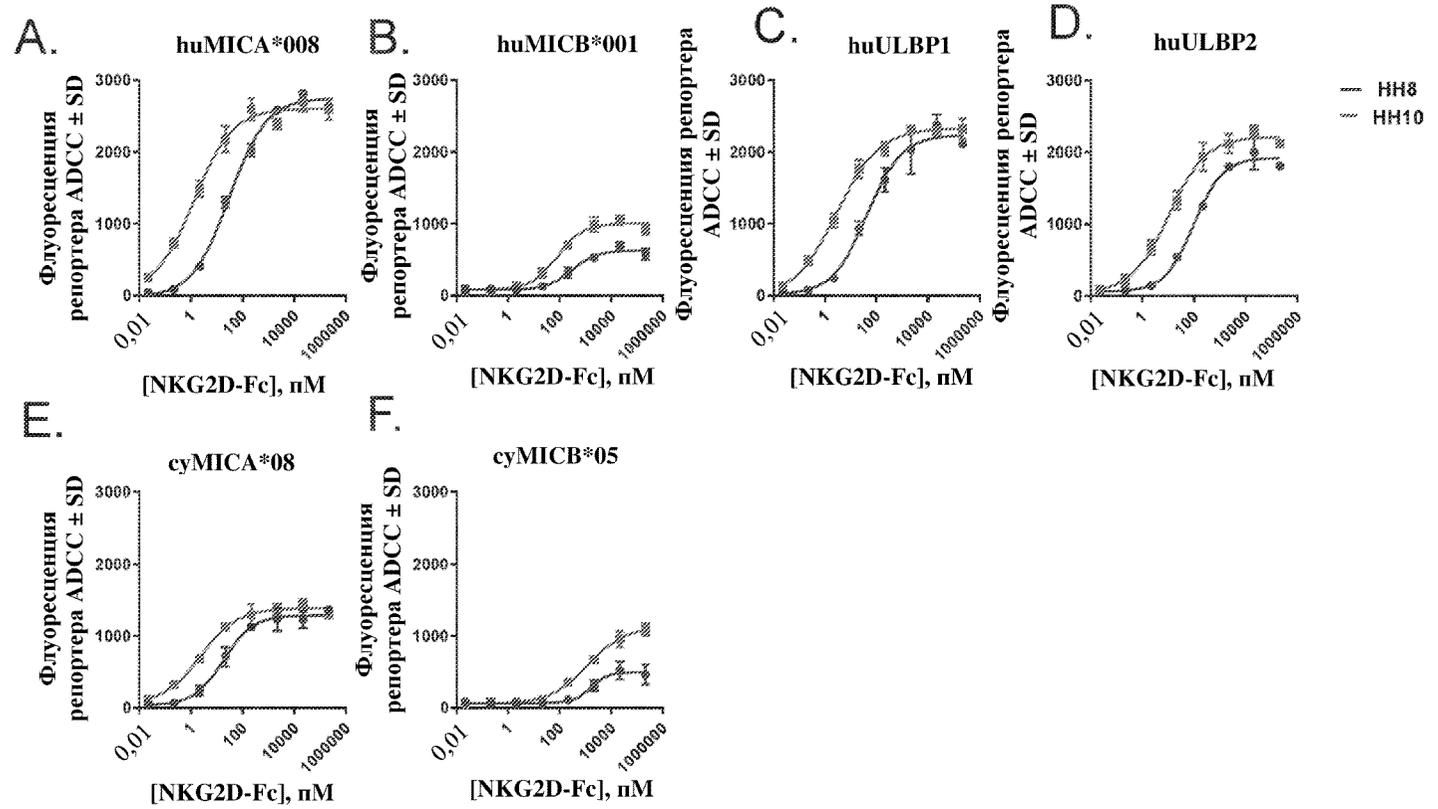


Фиг. 18

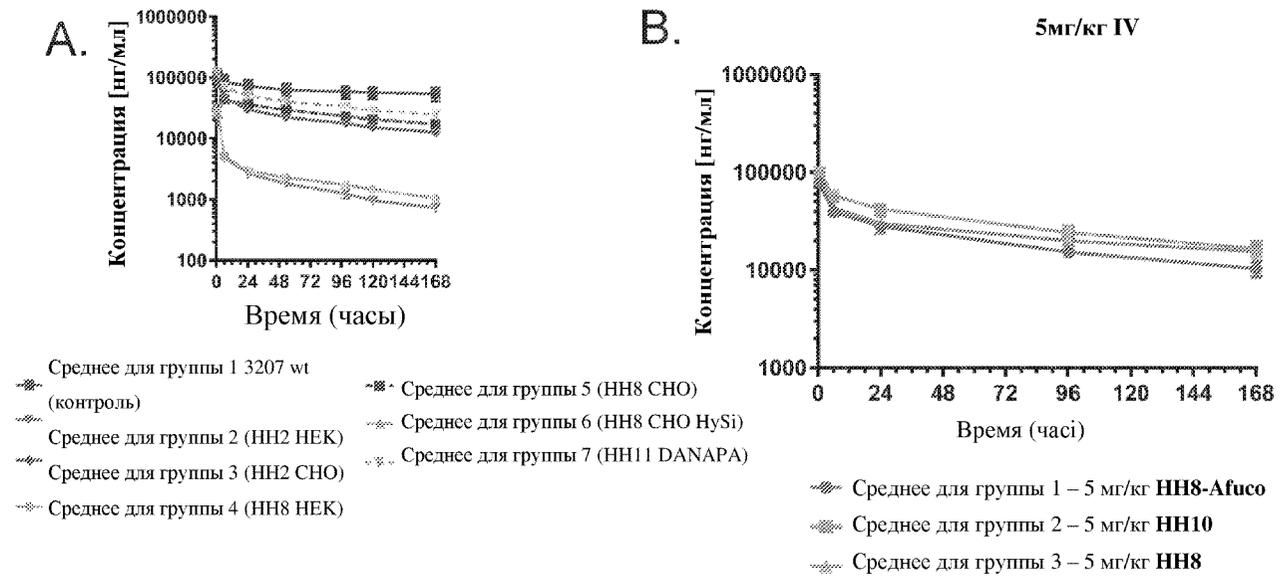
**ADCP,
первичные мышечные макрофаги
CT26.WT + экспрессия человеческого ULBP2**



Фиг. 19

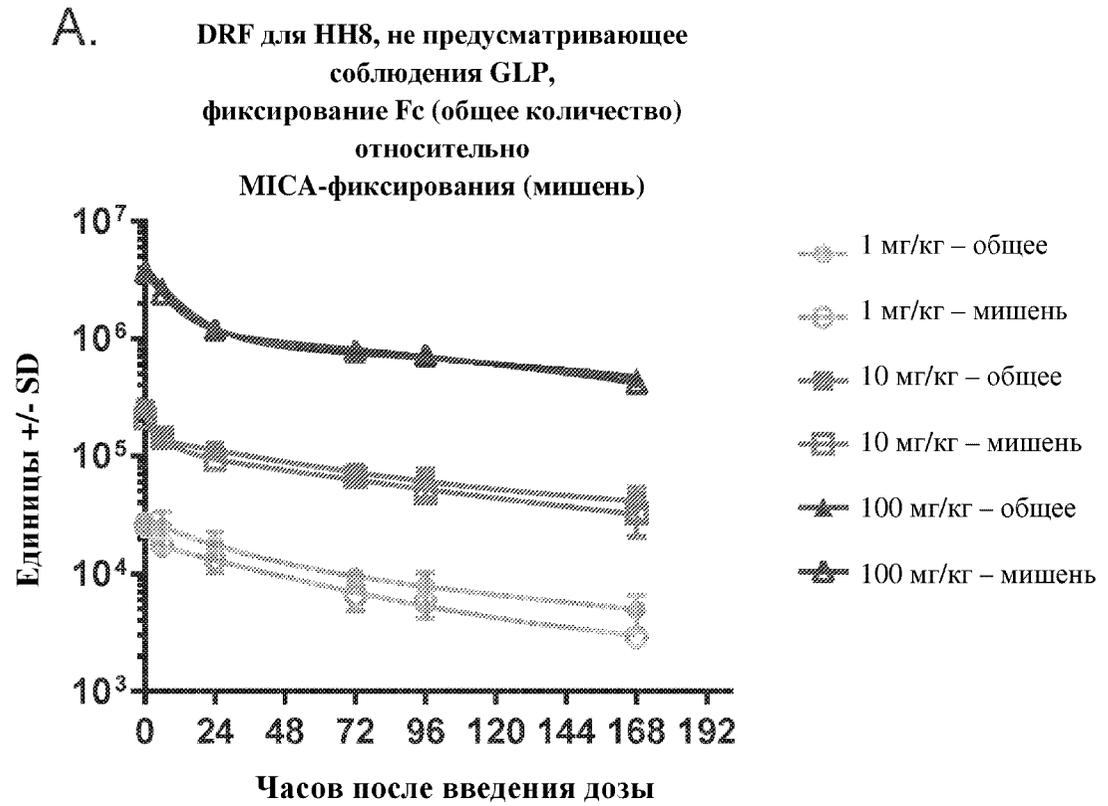


Фиг. 20



#На основе аллометрического масштабирования от мыши до яванского макака.

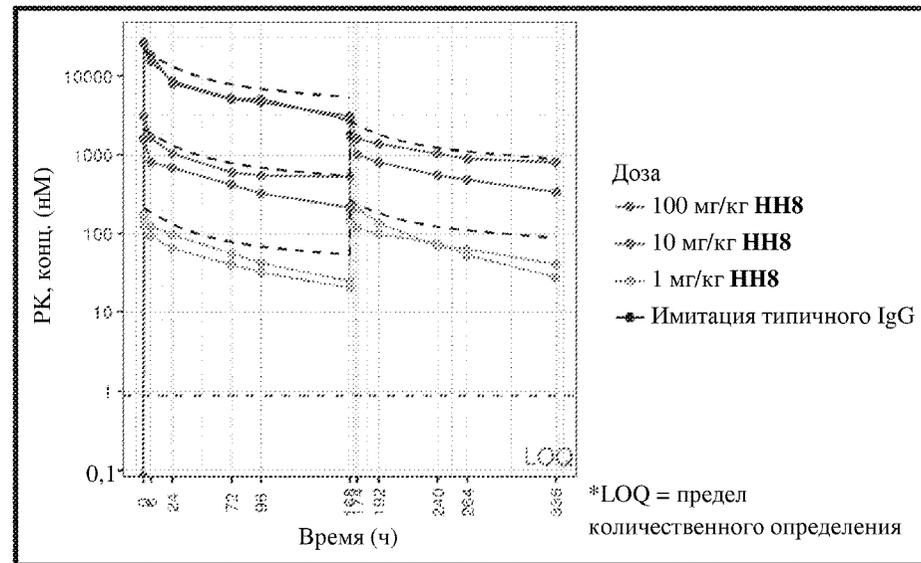
Фиг. 21



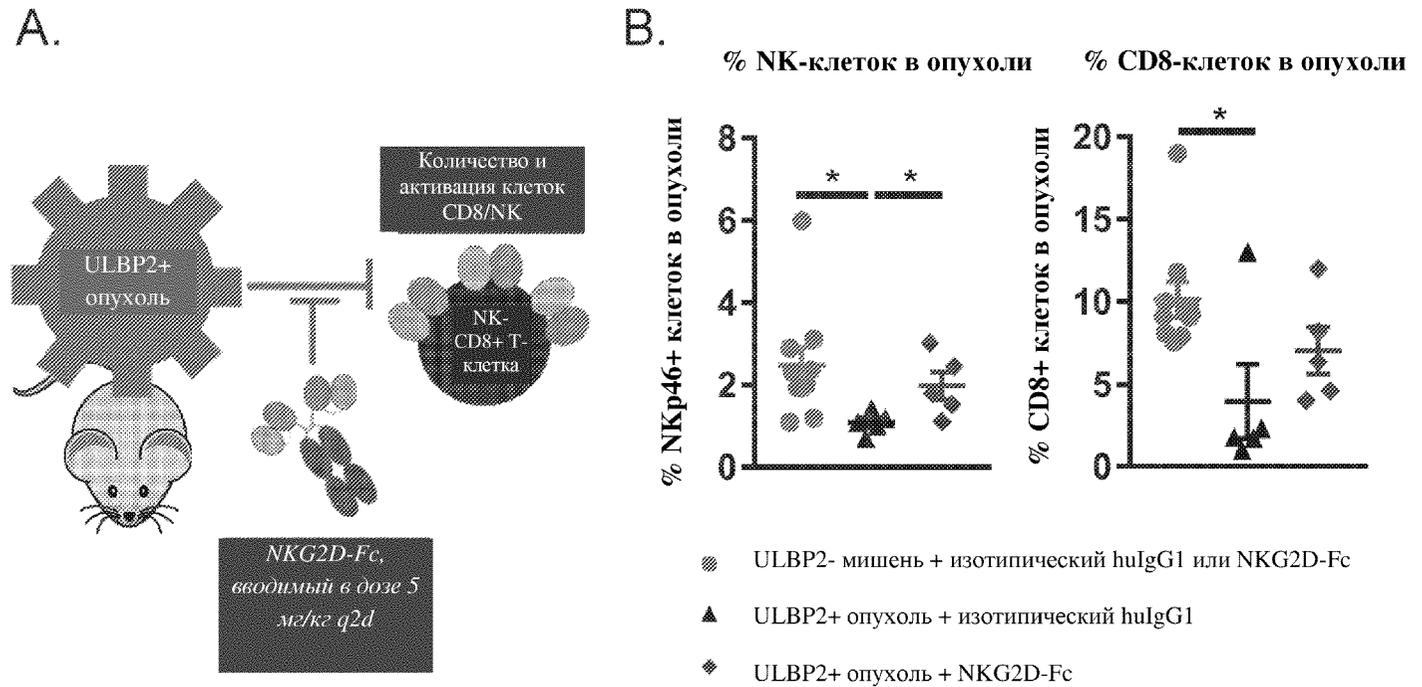
Фиг. 21, продолжение

В.

РК НН8 для яванского макака

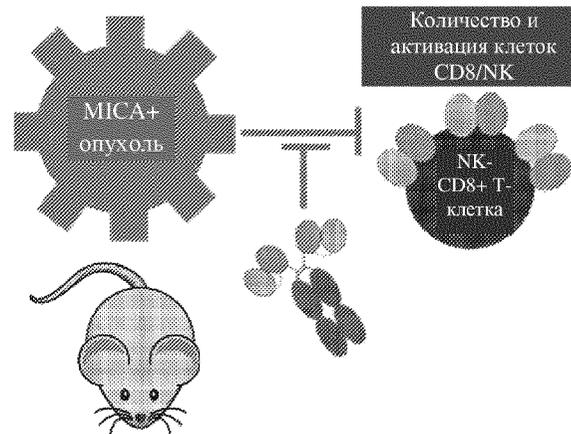


Фиг. 22



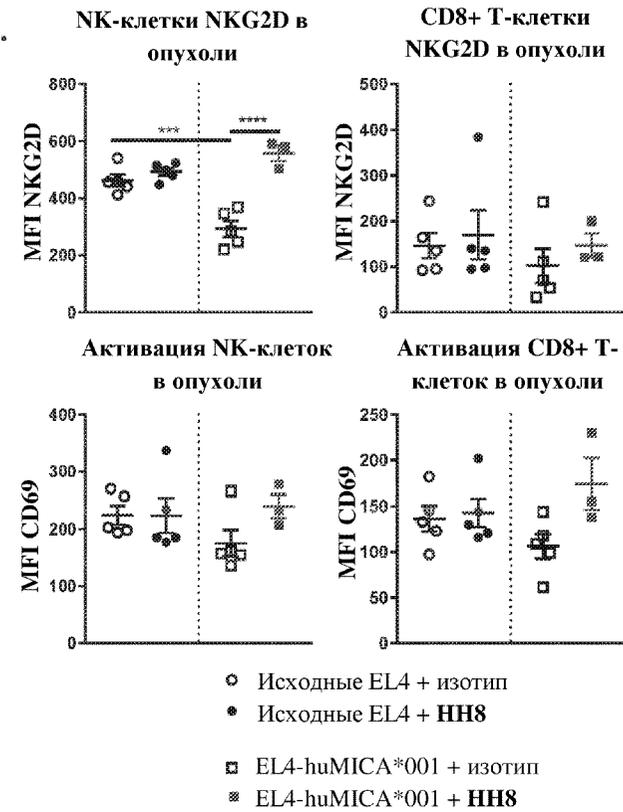
Фиг. 23

A.



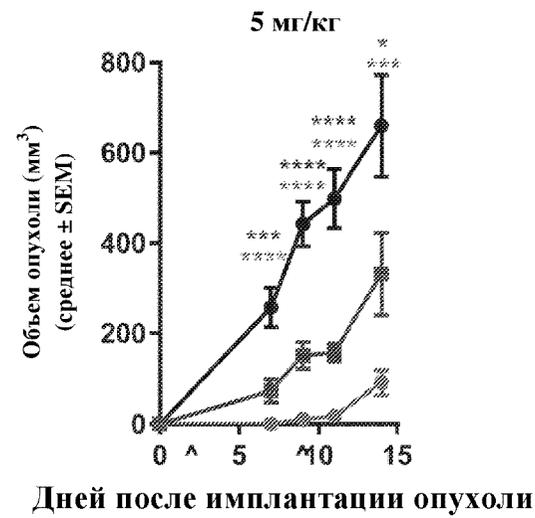
NKG2D-Fc, вводимый в дозе 20 мг/кг в день 2
Сбор опухолевого материала проводили через 5
дней после введения дозы

B.



Фиг. 24

А. Обработка с помощью EL4-huMICA*001 в количестве 5 мг/кг



- Изотип
- NN8
- ▨ NN10

В.

Время до достижения конечной точки

