

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045300**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.14

(21) Номер заявки
201991632

(22) Дата подачи заявки
2018.02.28

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

(54) КОМБИНАЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD16A С ЦИТОКИНОМ

(31) 17158563.1

(32) 2017.02.28

(33) EP

(43) 2020.03.12

(86) PCT/EP2018/054990

(87) WO 2018/158350 2018.09.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АФФИМЕД ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
**Кох Йоахим, Тредер Мартин, Паль
Йенс, Ройш Уве, Росс Торстен,
Райковиц Эрих, Цервенка Адельхайд
(DE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2 December 2016 (2016-12-02), PAHL JENS ET AL: "AFM13 Is the Most Advanced Bispecific NK-Cell Engaging Antibody in Clinical Development Substantially Enhancing NK-Cell Effector Function and Proliferation", XP002771625, Database accession no. PREV201700297384 abstract

Pahl et al: "NK cell Activation by the bispecific CD30/CD16A TandAb AFM13 substantially enhances NK cell effector functions and proliferation", 29 September 2016 (2016-09-29), XP002771626, Retrieved from the Internet: URL:https://www.nk2016.it/pdf/nk-cell-activation-and-memory/Pahl%20Jens.pdf [retrieved on 2017-06-30] the whole document

WO-A1-2016177846

JENS H.W. PAHL ET AL: "CD16A activation of NK cells promotes NK cell proliferation and memory-like cytotoxicity against cancer cells", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, 7 March 2018 (2018-03-07), XP055466221, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0550 page 2 abstract

Pahl et al: "Abstract 2997: The tetravalent bispecific antibody AFM13 engages and primes innate immune cells for anti-cancer immunity", AACR Annual Meeting Cancer Research, vol. 77, no. 13 Suppl April 2017 (2017-04), 2017, XP002780002, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/77/13_Supplement/2997 the whole document

(57) В рамках настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий белок против CD16A для применения в иммунотерапии с применением NK-клеток, при этом указанный антигенсвязывающий белок против CD16A следует вводить с перерывами и в комбинации с цитокином. В некоторых вариантах реализации, антигенсвязывающий белок представляет собой четырехвалентное и биспецифичное тандемное диатело к CD30/CD16A.

B1

045300

045300 B1

Область техники

В настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий белок, взаимодействующий с CD16A, который вводят периодически, совместно с цитокином для иммунотерапии, с применением НК-клеток. Согласно определенным вариантам реализации, настоящее изобретение относится к биспецифичному и четырехвалентному тандемному диателу с антигенсвязывающими участками для CD16A для привлечения НК-клеток для применения при лечении рака или (вирусных) инфекций, при этом указанное тандемное диатело вводят периодически, в комбинации с цитокином. Примерами являются взаимодействующие с CD16A тандемные диатела, такие как тандемное диатело AFM13 к CD30/CD16A, тандемное диатело AFM24 к EGFR/CD16A и тандемное диатело AFM26 к BCMA/CD16A.

Уровень техники

В WO2006/125668 раскрыт антигенсвязывающий белок, а именно биспецифичное тандемное диатело к CD30/CD16A, и его применение для иммунотерапии на основе НК-клеток.

В WO2016/177846 раскрыта комбинация биспецифичного тандемного диатела к CD30/CD16A и антагониста PD-1 для применения ее при лечении лимфомы Ходжкина.

Клетки естественные киллеры (НК) представляют собой цитотоксические, продуцирующие IFN- γ лимфоциты, являющиеся компонентом врожденной иммунной системы, которые, как считается, составляют первую линию защиты от инфицированных вирусом клеток и раковых клеток (Cerwenka and Lanier, 2001; Spits, et al., 2013).

В отличие от CD8⁺ Т-клеток, НК-клетки различают аномальные клетки с помощью определенного набора рецепторов, кодируемых зародышевой линией, таких как ингибиторные рецепторы KIR и NKG2A и активирующие рецепторы NKG2D, DNAM-1 и NCR (Koch et al., 2013; Pahl and Cerwenka, 2017). НК-клетки реагируют на клетки, которые демонстрируют пониженные уровни или несовместимый репертуар ингибирующих молекул МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости) класса I, позволяя распознавать некоторые раковые клетки, которые могли избежать ответов CD8⁺ Т-клеток. Низкая экспрессия ингибирующих лигандов в сочетании с высокими уровнями экспрессии активирующих лигандов на клетках-мишенях приводят к активации НК-клеток и высвобождению перфорина и гранзима В, опосредуя гибель клеток-мишеней (Gasser and Raulet, 2006; Moretta, et al., 2006). Кроме того, активация НК-клеток стимулируется цитокинами, такими как IL-2 или IL-15, которые усиливают способность НК-клеток реагировать на клетки-мишени (Koehl et al., 2016).

В дополнение к своему прямому противоопухолевому действию, НК-клетки способствуют индукции адаптивных противораковых ответов и могут выполнять иммунорегуляторные функции (Schuster, et al., 2016). Накапливаемые данные подтверждают концепцию, что подмножества НК-клеток могут охватывать широкое фенотипическое и функциональное разнообразие (Roelle and Brodin, 2016; Tesi, et al., 2016). Кроме того, НК-клетки могут приобретать свойства приобретенного иммунитета и иммунологической памяти, такие как расширение специфичных субпопуляций и антиген-специфичные ответы (Sun, et al., 2014). В этом контексте было показано, что предварительная активация НК-клеток IL-12/15/18 усиливает и продлевает способность НК-клеток реагировать на опухолевые клетки и цитокины, что было связано с эпигенетическим ремоделированием локуса IFN- γ (Cerwenka and Lanier, 2016; Luetke-Eversloh, et al., 2014; Ni, et al., 2016; Romee et al., 2016).

В то время как НК-клетки, по определению, не требуют предварительной сенсibilизации, свежewe-выделенные (т.е. "наивные") НК-клетки человека без дальнейшей активации реагируют только на ограниченное число опухолевых клеток, таких как прототипная линия клеток-мишеней K562 (Vivier, 2011). В частности, НК-клетки от пациентов с раком проявляют низкую реактивность по отношению к аутологичным опухолевым клеткам, в случае отсутствия активации цитокинами *ex vivo* (Parkhurst, et al., 2011, Reiners, et al., 2013). Это может отражать недостаточное распознавание опухолевых клеток, ингибирующее действие иммуносупрессивного микроокружения опухоли и непрерывное изменение способности НК-клеток реагировать *in vivo*.

Терапевтические антитела, реагирующие на опухоль, могут значительно улучшить цитотоксичность наивных НК-клеток по отношению к опухолевым клеткам даже в присутствии собственного МНС класса I (Harris, 2004; Pahl, et al., 2012; Parkhurst, et al., 2011; Reiners, et al., 2013). Указанная антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) опосредуется распознаванием участка Fc человека гуманизированных и химерных IgG1 антител посредством связанного с активационным тирозинсодержащим мотивом иммунорецепторов (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) активирующим НК-клетки рецептором CD16A (Fc γ RIIIA) (de Landazuri, et al., 1979; Lanier, et al., 1988; Vivier, et al., 1991). Вывод о роли НК-клеток и ADCC в клиническом ответе терапевтических антител был сделан исходя из наблюдения, что у пациентов, имеющих аллотипы CD16A с высокой аффинностью (полиморфизмы генов 158V против 158F), прогноз более благоприятный (Bibeau, et al., 2009; Dall'Ozzo, et al., 2004; Musolino, et al., 2008).

Однако пациенты со множественной миеломой имеют повышенные уровни IgG в сыворотке по сравнению с другими пациентами с раком или здоровыми индивидуумами, и диспропорция в аффинности к CD16A у пациентов с миеломой, а также потенциальная конкуренция за связывание CD16A при

таких патофизиологических концентрациях в сыворотке между IgG человека и обычными терапевтическими антителами может затруднять проявление всего потенциала ADCC и NK-клеток в условиях *in vivo* (Li, et al., 2016). Для улучшения взаимодействия с CD16A были разработаны форматы антител, которые связывают CD16A Fc-независимым образом с высокой аффинностью (Rothe, et al., 2015; Wiernik, et al., 2013). AFM13 представляет собой четырехвалентное биспецифичное тандемное диатело к CD30/CD16A (tandem diabody, TandAb®), обладающее способностью к двухвалентному связыванию как с CD30, так и с CD16A с высокой аффинностью и специфичностью (Reusch et al., 2014). AFM13 проходит фазу 2 клинических исследований в формате монотерапии и фазу 1b клинических исследований в комбинации с пембролизумабом у пациентов с CD30⁺ классическими и неклассическими лимфомами Ходжкина (WO2016/177846).

Краткое описание изобретения

Несмотря на то, что CD16A является мощным активирующим рецептором на NK-клетках человека, который опосредует цитотоксичность NK-клеток по отношению к опсонизированным антителами раковым клеткам, существует необходимость дополнительно повысить эффективность и силу активации цитотоксичности NK-клеток за счет обеспечения взаимодействия с CD16A посредством антигенсвязывающего белка.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что взаимодействие с CD16A посредством мультиспецифичного антитела, такого как биспецифичное тандемное диатело к CD30/CD16A (AFM13), изменяет фенотип и функцию первичных NK-клеток. После первоначального улучшения функциональности NK-клеток воздействие антигенсвязывающего белка против CD16A (через тандемное диатело) приводит к кратковременному избирательному снижению цитотоксической активности. Однако эта нарушенная цитотоксичность NK-клеток может быть устранена путем стимуляции цитокинами. В примерах показано, что после культивирования NK-клеток в присутствии IL-2 в течение периода без воздействия антигенсвязывающего белка, указанные CD16A-опытные NK-клетки демонстрируют более выраженную цитотоксичность и продукцию IFN- γ при повторной стимуляции цитокинами или же устойчивыми опухолевыми клетками, что свидетельствует о наличии у NK-клеток функциональности, подобной памяти.

Следовательно, изобретение, предложенное в настоящей заявке, раскрывает пока еще не оцененную роль активации CD16A в возникновении и усилении ответов NK-клеток на цитокины и последующую повторную стимуляцию опухолевыми клетками. В настоящем изобретении предложена схема периодического введения антигенсвязывающего белка против CD16A, например тандемного диатела к CD30/CD16A (AFM13), тандемного диатела AFM24, специфичного к EGFR/CD16A или тандемного диатела AFM26, специфичного к BCMA/CD16A, отдельно либо в комбинации с обработкой активирующими NK-клетки цитокинами в течение периода без воздействия антигенсвязывающего белка против CD16A, который улучшает ответы NK-клеток.

Изобретение раскрывает новую дополнительную роль CD16A в стимуляции и усилении ответов NK-клеток на цитокины и на последующую повторную стимуляцию опухолевыми клетками. Это означает, что стимуляция с помощью тандемного диатела CD30/CD16A в примерах может приводить не только к уничтожению неопсонизированных CD30⁺ опухолевых клеток, но даже CD30⁻ опухолевых клеток, которые не являются непосредственно мишенями для тандемного диатела CD30/CD16A. Эти результаты требуют применения периодического режима введения антигенсвязывающего белка против CD16A в комбинации с цитокином. Данный периодический и комбинаторный режим лечения увеличивает количество опухолево-реактивных NK-клеток и повышает их функциональность у пациентов.

CD16A является единственным активирующим рецептором, стимулирующим цитотоксическую активность наивных NK-клеток человека даже в отсутствие костимулирующих сигналов (Brucson, et al., 2009; Brucson, et al., 2006). В примерах показано, что активация CD16A биспецифичным четырехвалентным тандемным диателом CD30/CD16A вызывает сильную цитотоксичность NK-клеток в ответ на резистентные к NK-клеткам CD30⁺ клетки лимфомы. Важно отметить, что в примерах показано, что взаимодействие CD16A с тандемным диателом к CD30/CD16A повышает чувствительность NK-клеток к IL-15 или низкой дозе IL-2. Это приводит к усилению IL-15 и IL-2-зависимой пролиферации NK-клеток, что приводит к значительному увеличению числа высоко функциональных NK-клеток. После первоначальной превосходной активности NK-клеток по отношению к опсонизированным тандемным диателом к CD30/CD16A опухолевым клеткам, увеличение продолжительности воздействия тандемного диатела к CD30/CD16A приводит к нарушению цитотоксичности NK-клеток и снижению продукции IFN- γ . Однако это снижение эффективности является временным, поскольку оно может быть восстановлено после культивирования таких NK-клеток с IL-2 или IL-15. Примечательно, что когда указанные NK-клетки, культивируемые с цитокинами, предварительно активируют тандемным диателом к CD30/CD16A через CD16A, они проявляют повышенную цитотоксичность и продукцию IFN- γ после повторной стимуляции в отношении в иных случаях устойчивых CD30⁺ и даже CD30⁻ клеток лимфомы. Такая нарушенная цитотоксичность NK-клеток, которая может быть повторно стимулирована последующей обработкой цитокинами, также является результатом действия других антигенсвязывающих белков к CD16A, таких как биспецифичные тандемные антитела, такие как антитела к EGFR/CD16A или BCMA/CD16A. Следова-

тельно, настоящее изобретение раскрывает недооцененную роль стимуляции CD16A в возникновении и усилении функций NK-клеток в ответ на активацию цитокинами и опухолевыми клетками.

Повышенная чувствительность к IL-15 и низкой дозе IL-2 согласуется с индукцией CD25, α -цепи высокоаффинного рецептора IL-2, и повышением экспрессии CD132, γ -цепи с низкой аффинностью, которая является частью рецепторов IL-2 и IL-15. Индукция CD25 тандемным диателом к CD30/CD16A значительно сильнее, чем было показано ранее при перекрестном сшивании CD16A с использованием антитела 3G8 к CD16 со вторичным антителом (Marquez, et al., 2010). Сходным образом, было показано, что активация NK-клеток IL-12/15/18 индуцирует устойчивую экспрессию CD25, усиливая IL-2-зависимую пролиферацию *in vitro* и *in vivo* у мышей с опухолями (Ni, et al., 2012). Следовательно, индукция CD25 после воздействия тандемного диатела к CD30/CD16A позволяет NK-клеткам конкурировать за низкие количества IL-2 с регуляторными T-клетками, которые в противном случае ограничивают доступность IL-2 для NK-клеток вследствие конститутивной экспрессии CD25 (Gasteiger, et al., 2013; Kim, et al., 2017). В дополнение к тандемному диателу, взаимодействующему с CD16A, Fc-опосредованное взаимодействие CD16A с ритуксимабом приводит к повторному усилению пролиферативного потенциала, а также временному снижению активности, что указывает на более глобальный феномен активации CD16A. Однако изменения CD25 и CD16 в ответ на взаимодействующее с CD16A тандемное диателом, являются менее гетерогенными и более выраженными среди здоровых доноров по сравнению с ритуксимабом. Глубокий активирующий потенциал взаимодействующего с CD16A тандемного диатела может быть отнесен к его продолжительному и высокоаффинному двухвалентному связыванию с CD16A независимо от полиморфизмов CD16A (низкая или высокая аффинность к Fc-доменам антител IgG) по сравнению со связывающим Fc ритуксимабом (Reusch, et al., 2014).

После воздействия тандемного диатела, взаимодействующего с CD16A, наблюдали временное и избирательное снижение выраженности CD16A-зависимой и даже "естественной" цитотоксичности NK-клеток, дегрануляции и IFN- γ во втором ответе на опухолевые клетки. Нарушение CD16A-зависимой активности может быть объяснено почти полной потерей экспрессии CD16 при взаимодействии с CD16A, что, по меньшей мере, частично включает MMP(матриксная металлопротеаза)-опосредованное расщепление, или интернализацией рецептора, как описано дополнительно (Caruano, et al., 2015; Lajoie, et al., 2014; Mota, et al., 2004; Romee, et al., 2013; Wiernik, et al., 2013). Кроме того, временное снижение активности "наивных" NK-клеток, противоопухолевая реактивность предполагают десенсибилизацию других рецепторов, активирующих NK-клетки, таких как NKp30 и NKG2D, которые, как показано, участвуют в лизисе K562 (Brandt, et al., 2009; Kuylenstierna, et al., 2011). Снижение дегрануляции и продукции IFN- γ даже в ответ на PMA/иономицин свидетельствует о более широком кратковременном снижении активности, которое, по-видимому, также влияет на активацию PKC и/или мобилизацию Ca²⁺, которые непосредственно активируются PMA/иономицином (Chatila, et al., 1989). Мобилизация Ca²⁺ критически важна в терминальной передаче сигналов CD16A и других активирующих рецепторов (Bryceson, et al., 2006; Cassatella, et al., 1989). Активация PKC может опосредовать продукцию IFN- γ и важна для лизиса K562, но не обязательна для ADCC, которая, в свою очередь, требует активации PI3K (Bonnema, et al., 1994; Hara, et al., 2008).

Следовательно, наблюдаемое временное снижение активности первичных NK-клеток после 20-часового воздействия тандемного диатела, например тандемного диатела к CD30/CD16A, может преодолевать более ограниченный ингибирующий эффект, который ранее был обнаружен в результате кратковременного (1,5 ч) взаимодействия с CD16A; сообщали, что указанное ингибирование включает рекрутирование SHP-1 и ингибирование фосфорилирования PLC γ 2/Vav-1/SLP-76, что приводит к неправильной дегрануляции, тогда как продукция IFN- γ и чувствительность к PMA/иономицину остаются неизменными (Caruano, et al., 2015; Galandrini, et al., 2002).

Ответ IFN- γ на IL-12/15/18 после взаимодействия с CD16A сохраняется или даже еще больше усиливается, что указывает на то, что NK-клетки после воздействия тандемного диатела, например, тандемного диатела к CD30/CD16A на CD16A, имеют только избирательное снижение IFN- γ при активации опухолевыми клетками. Это может быть объяснено повышением экспрессии высокоаффинных рецепторов IL-12 и IL-18, которые эффективно индуцируют IFN- γ . Сообщалось, что активация рецепторов CD16A и IL-12 может синергически стимулировать продукцию IFN- γ (Kondadasula, et al., 2008).

В целом, кратковременное снижение активности NK-клеток при воздействии тандемного диатела, например тандемного диатела к CD30/CD16A, на CD16A, может быть полностью восстановлено после последующего культивирования с IL-2 или IL-15. Важно отметить, что указанные CD16A-опытные, культивированные с цитокином NK-клетки обладают функциями, подобными памяти, так как цитотоксическая активность и продукция IFN- γ по отношению к повторной стимуляции в ином случае слабо восприимчивыми клетками лимфомы значительно повышена. Интересно, что данная новая функция "CD16A-индуцированных NK-клеток с функцией, подобной памяти", может быть аналогична ранее описанной усиленной противоопухолевой активности и IFN- γ ответу IL-12/15/18-индуцированных NK-клеток, с функциями, подобными памяти (Cooper, et al., 2009; Ni, et al., 2016; Ni, et al., 2012; Romee, et al., 2012; Romee et al., 2016).

Это иллюстрирует то, что схема периодического дозирования антигенсвязывающего белка против CD16A, например, тандемного диатела, включающая период без воздействия антигенсвязывающего белка, улучшает чувствительность отдельных NK-клеток к повторному взаимодействию с опсонизированными антителами опухолевыми клетками. Кроме того, периодическое введение антигенсвязывающей молекулы, взаимодействующей с CD16A, с активирующими NK-клетки цитокинами, такими как IL-2 или IL-15, в соответствии с настоящим изобретением, не только поддерживает, но даже обеспечивает усиленную противоопухолевую активность NK-клеток и увеличивает количество опухолево-реактивных NK-клеток у пациентов с лимфомой.

Включение посредством ссылки.

Содержание всех публикаций, патентов и заявок на патенты, упомянутых в данном описании, включено в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент конкретно и индивидуально указывались как включенные посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны индуцирование цитотоксичности NK-клеток, продукции IFN- γ и активирующих рецепторов опухолевыми клетками, опсонизированными тандемным диателом KCD30/CD16A.

А. Специфичный лизис CD30⁺ CD19⁻ клеток Karpas-299 и L428, и CD30⁺CD19⁻ клеток Daudi свежeweыделенными первичными NK-клетками измеряли в 4-часовых анализах высвобождения ⁵¹Cr в присутствии тандемного диатела AFM13 к CD16AхCD30 (круги), тандемного диатела AFM12 к CD16AхCD19 (ромбы) (все в концентрации 10 мкг/мл) по сравнению с отсутствием добавления антител (квадраты) при повышении соотношения эффектор-мишень (Е:Т); данные являются репрезентативными как минимум для трех экспериментов. В. Кумулятивный специфичный лизис клеток Karpas-299, L428 и Daudi (Е:Т 6:1) с/без AFM13. С. AFM13-индуцированный лизис (круги) клеток Karpas-299 и L428 NK-клетками сравнивали с лизисом, индуцированным родительским химерным антителом IgG против CD30 (треугольники) в диапазоне концентраций антител 10⁻⁵-10 мкг/мл. (Е:Т 25:1). AFM12 был использован в качестве отрицательного контроля (ромбы). D. Специфичный лизис Karpas-299 и L428 в присутствии AFM13 (1 мкг/мл) сравнивали между выделенными NK-клетками (круги) и цельными РВМС (квадраты) при соответствующих соотношениях Е:Т. Лизис обедненных по NK-клеткам РВМС (РВМС Δ НК) (треугольники) корректировался на отсутствие NK-клеток; данные являются репрезентативными для двух экспериментов. Е. Экспрессию CD107a в NK-клетках (маркер дегрануляции) и внутриклеточную экспрессию IFN- γ измеряли с помощью проточной цитометрии после 4-часового совместного культивирования выделенных NK-клеток и клеток L428 (Е:Т 1:1) с/без AFM13 (0,4 мкг/мл), как указано. Продукцию IFN- γ количественно определяли с помощью ELISA после 20-часового совместного культивирования; совокупные данные четырех экспериментов.

На фиг. 2 показано, что предварительная активация через CD16A тандемным диателом к CD30/CD16A усиливает пролиферацию и приводит к увеличению количества NK-клеток в ответ на IL-15 или низкую дозу IL-2.

А. Схема эксперимента. В. Экспрессия CD25, CD122 и CD132 после 20-часового культивирования NK-клеток в среде или на покрытом AFM13 пластике (покрытие) (1 мкг/лунка) (обозначаемом как предварительная активация AFM13), изображенном в качестве репрезентативных гистограмм, и кратное изменение по сравнению со средой (совокупные данные пяти экспериментов). Покрытие IgG1 мыши использовали в качестве отрицательного контроля (контроль покрытия). С. После культивирования в среде или на AFM13 в виде покрытия меченные CFSE NK-клетки собирали, размножали и инкубировали с IL-2 (400 ед/мл) в течение 3-7 дней; после этого экспрессию CFSE измеряли проточной цитометрией; репрезентативные данные для двух экспериментов (указаны значения MFI). D. Процент NK-клеток, которые подверглись, по меньшей мере, четырем делениям (рассчитанным по разведению CFSE), оцененным после 5-дневного культивирования в IL-2 (400 ед/мл) после предварительной активации AFM13 или среды; совокупные данные пяти экспериментов. Е. Экспрессия CFSE и абсолютное количество NK-клеток после 5-дневного культивирования при возрастающих концентрациях IL-2 (12,5-400 ед/мл) или F. IL-15 (0,6-10 нг/мл) предварительно активированные AFM13 NK-клетки или контрольные NK-клетки.

Данные двух экспериментов.

На фиг. 3 показано восстановление цитотоксичности NK-клеток после временной дисфункции после воздействия AFM13.

А. Схема эксперимента. В. Экспрессию CD16 измеряли на NK-клетках после 20-часового совместного культивирования с клетками Karpas-299 с AFM13 или после культивирования на AFM13 в виде покрытия (или в контроле, как на фиг. 2, В); репрезентативные гистограммы шести экспериментов. С. Экспрессия CD16 на NK-клетках (а) после воздействия AFM13 в виде покрытия или (б) среды, или на NK-клетках после культивирования в IL-2 (400 ед/мл) в течение пяти дней после воздействия AFM13 в виде покрытия, или (д) без предварительного воздействия (только IL-2); MFI данные девяти экспериментов. D. лизис и Е. дегрануляция в опсонизированных AFM13 клеток Karpas-299 клетками NK, которые культивировали, как описано в С; совокупные данные (Е:Т 2,5:1) от двух до пяти экспериментов. F. естест-

венный лизис и G. дегрануляция клеток K562 NK-клетками, которые были культивированы, как описано в С; совокупные данные (Е:Т 2,5:1) от двух до шести экспериментов.

На фиг. 4 показано восстановление IFN- γ NK-клеток после кратковременной селективной дисфункции после воздействия тандемного диатела CD30/CD16A.

Внутриклеточная экспрессия IFN- γ в ответ на А. опсонизированные AFM13 клетки Karpas-299, В. клетки K562 и С. IL-12/15/18 NK-клетками, которые культивировали, как описано на фиг. 3, С; совокупные данные от двух до четырех экспериментов. D. Экспрессия высокоаффинных IL-12R β 2 и IL-18R α на NK-клетках, предварительно активированных AFM13 в виде покрытия или культивированных в среде (левая пара гистограмм); и NK-клетками, культивируемыми в IL-2 в течение 5 дней после воздействия AFM13 или в IL-2 без предварительного воздействия (правая пара гистограмм); репрезентативные данные для четырех экспериментов.

На фиг. 5 показано, что предварительная активация тандемным диателом к CD30/CD16A стимулирует продукцию NK-клетками с функциями, подобными памяти, IFN- γ , и цитотоксичность.

А. продукция IFN- γ в ответ на 24-часовую повторную стимуляцию NK-клеток IL-12/15, K562, L428, культивируемых в IL-2 в течение 5 дней после воздействия AFM13 в виде покрытия, или культивируемых только в IL-2 без предварительного воздействия; совокупные данные пяти экспериментов. В. лизис не опсонизированных CD30⁺ Karpas-299 и HDLM-2 клеток, а также CD30⁻ клеток Daudi и CD30⁺ клеток L1236 свежевыделенными NK-клетками, или NK-клетками, культивируемыми в IL-2 в течение 5 дней, следующих за воздействием AFM13 в виде покрытия или культивированными только в IL-2 без предварительного воздействия; совокупные данные от двух до шести экспериментов.

На фиг. 6 показано временное снижение способности NK-клеток уничтожать клетки-мишени после повторного воздействия AFM13, несмотря на стимуляцию цитокинами.

А. Схема эксперимента: 1-ое взаимодействие с AFM13 в виде покрытия в течение 20 ч, последующее культивирование в IL-2 (400 ед/мл) в течение пяти дней и 2-ое взаимодействие с AFM13 в виде покрытия в течение дополнительных 2 дней В. Лизис AFM13-опсонизированных клеток Karpas-299 NK-клетками, которые культивировали, как описано в А (Е:Т 2,5:1).

На фиг. 7 показано, что тандемное диатело к EGFR/CD16A (AFM24) и тандемное диатело к VCMA/CD16A (AFM26) индуцируют функциональную активацию NK-клеток в ответ на EGFR⁺ и VCMA⁺ клетки-мишени соответственно. Показана цитотоксическая активность NK-клеток в присутствии AFM24 (тандемное диатело к EGFR/CD16A) и AFM26 (тандемное диатело к VCMA/CD16A) на EGFR⁺ клетках-мишенях А-431 и VCMA⁺ клетках-мишенях MM.1S. 4-часовое высвобождение кальцеина с O/N-культивируемыми NK-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 2,5:1. N=2 независимых эксперимента.

На фиг. 8 показано восстановление функции NK-клеток, опосредованной CD16A, после воздействия AFM24 (тандемного диатела к EGFR/CD16A) и AFM26 (тандемного диатела к VCMA/CD16A), соответственно.

А. Экспериментальная схема оценки фенотипического и функционального восстановления NK-клеток после воздействия AFM24 и AFM26 соответственно. В. Проточный цитометрический анализ CD16 на поверхности NK-клеток при 24-часовом воздействии PBS или 10 мкг/мл AFM24 и AFM26 в виде покрытия, соответственно. Показана экспрессия CD16 на поверхности клеток в отсутствие и в присутствии указанных цитокинов во время фазы восстановления (с 1 по 6 день). NK-клетки были идентифицированы как CD45⁺ CD56⁺ жизнеспособные клетки методом проточной цитометрии. С. Количественная оценка экспрессии CD16 на поверхности NK-клеток при воздействии связанных с планшетами AFM24 и AFM26. N=2 независимых эксперимента. D. Оценка специфичной функции цитотоксических NK-клеток в присутствии клеток-мишеней AFM24 А-431 и AFM26 MM. 1S при соотношении Е:Т 2,5:1. Соответствующее тандемное диатело было добавлено к используемому 4-часовому анализу высвобождения кальцеина (с=1 мкг/мл). NK-клетки обрабатывали 400 ед/мл IL-2, если указано. N=2 независимых эксперимента.

На фиг. 9 показано восстановление функции NK-клеток, опосредованной CD16A, после воздействия AFM24 (EGFR/CD16A) и AFM26 (VCMA/CD16A), соответственно.

А. Количественная оценка экспрессии CD16 на поверхности NK-клеток при воздействии AFM24 и AFM26. N=2 независимых эксперимента. В. Оценка специфичной цитотоксической функции NK-клеток в присутствии клеток-мишеней AFM24 А-431 и клеток-мишеней AFM26 MM. 1S при соотношении Е:Т 2,5:1. Соответствующее тандемное диатело добавляли к используемому 4-часовому анализу высвобождения кальцеина (с=1 мкг/мл). NK-клетки обрабатывали 10 нг/мл IL-15, если указано. N=2 независимых эксперимента.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий белок, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий участок для CD16A, для применения в иммунотерапии на основе NK-клеток, при этом антигенсвязывающий белок вводят периодически, включая период без воздействия антигенсвязывающего белка между двумя перемежающимися, т.е. последовательными, дозами и, необязательно, в сочетании с цитокином.

Иммунотерапию на основе NK-клеток можно осуществлять *in vivo* и/или она может включать стадию *ex vivo*, например, адоптивный перенос NK-клеток или трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (НСТ), при котором либо аутологичные NK-клетки, либо аллогенные NK-клетки могут быть активированы цитокинами и размножены *ex vivo*, а затем перенесены пациенту.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок является мультивалентным и содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка, специфичных для CD16A, что приводит к двухвалентному связыванию с NK-клеткой через рецептор CD16A, тем самым увеличивая avidность и эффективность цитотоксической активации NK-клетки.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок является мультиспецифичным и содержит, по меньшей мере, один дополнительный антигенсвязывающий участок, специфичный для антигена-мишени, отличного от CD16A, для направления активности NK-клетки в сторону мишени, например, опухолевой клетки или вируса.

В конкретных вариантах реализации антигенсвязывающий белок представляет собой четырехвалентное биспецифичное тандемное диатело, содержащее два антигенсвязывающих участка для CD16A и два антигенсвязывающих участка для антигена мишени, например, опухолевого антигена или вирусного антигена.

Термин "комбинация" относится к одновременному, разделительному или последовательному введению соединений, входящих в комбинацию, т.е. антигенсвязывающего белка CD16A и цитокина.

Используемый в настоящей заявке термин "субъект" включает индивидуума, например, пациента, страдающего или пострадавшего от расстройства, подлежащего лечению иммунотерапией на основе NK-клеток, например, рака или любого расстройства, связанного с раком. В варианте реализации антигенсвязывающего белка к CD30/CD16A расстройство представляет собой CD30-положительную злокачественное новообразование, в частности CD30⁺ лимфому, такую как, например, лимфома Ходжкина, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL).

Термин "антигенсвязывающий белок" обозначает производное иммуноглобулина с антигенсвязывающими свойствами. Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению связывает NK-клетки посредством взаимодействия с CD16A. Антигенсвязывающий белок может содержать полипептиды иммуноглобулина, их фрагменты, конъюгаты или гибридные пептиды иммунологически функциональных участков иммуноглобулина, которые содержат участок связывания антигена. Связывающий белок содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, который является областью, частью или доменом связывающего белка, который связывается с антигеном. В некоторых вариантах реализации каждый антигенсвязывающий участок образован варибельным доменом тяжелой цепи (VH) и варибельным доменом легкой цепи (VL) иммуноглобулина, специфично связывающегося с тем же эпитопом антигена. Варибельный домен тяжелой цепи включает три области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3. Варибельный домен легкой цепи включает три определяющие комплементарность области (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3. В альтернативных вариантах реализации антигенсвязывающий участок может состоять только из тяжелой цепи или легкой цепи. Например, такой антигенсвязывающий участок может быть получен из нанотела, которое состоит только из тяжелой цепи и может связываться с CD16A в отсутствие легкой цепи. Нанотела, полученные из лам или верблюдов, были описаны ранее. Описан антигенсвязывающий участок на основе VH, имеющий специфичность к CD16A, который не содержит домен VL (Li et al., 2016). Связывающий белок может представлять собой IgG-подобный или не IgG-подобный гибридный пептид на основе Fv-доменов либо без, либо с дополнительными константными доменами. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения связывающий белок лишен константных доменов иммуноглобулина. Варибельные домены тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающего участка могут быть ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью пептидного линкера, или могут нековалентно связываться друг с другом с образованием антигенсвязывающего участка.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит антигенсвязывающий участок, который связывается с CD16A, но не с CD16B. Антигенсвязывающий участок, содержащий варибельные домены тяжелой и легкой цепи, связывающийся с CD16A, но не связывающийся с CD16B, может быть обеспечен антигенсвязывающим участком, который специфично связывается с эпитопом CD16A, который содержит аминокислотные остатки С-концевой последовательности SFFPPGYQ (SEQ ID NO: 11) и/или остатки G130 и или Y141 CD16A (SEQ ID NO: 20), которых нет в CD16B. Примеры антигенсвязывающих участков, содержащих варибельные домены тяжелой и легкой цепей, которые связываются с CD16A, но не с CD16B, описаны в WO 2006/125668.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой и легкой цепи, специфичный для CD16A, где (i) вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный для CD16A (VH_CD16A), содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 7; CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельный домен легкой цепи, специфичный для CD16A, содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В других вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит (a) вариабельный домен тяжелой цепи, специфичный для CD16A (VH_CD16A), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 10, и/или (b) вариабельный домен легкой цепи, специфичный для CD16A (VL_CD16A), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В альтернативных вариантах реализации домены тяжелой и легкой цепей включают иммунологически активные гомологи или варианты CDR или каркасных последовательностей, описанных в настоящей заявке. Соответственно, в некоторых вариантах реализации последовательность CDR в домене тяжелой или легкой цепи, которая связывается с CD16A, аналогична, но не идентична аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1-7. В некоторых случаях последовательность варианта CDR имеет идентичность 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1-7, и указанный вариант является иммунологически активным.

В других случаях последовательность варианта CDR включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют данную аминокислоту другой аминокислотой с аналогичными характеристиками и дополнительно включают среди алифатических аминокислот обмен между остатками аланина, валина, лейцина и изолейцина; обмен между гидроксильными остатками серина и треонина, обмен между кислотными остатками аспартата и глутамата, замены между амидными остатками аспарагина и глутамина, обмен основных остатков лизина и аргинина и замены среди ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В других случаях последовательность вариантов CDR модифицируют для изменения некритических (неключевых) остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые не являются критическими, могут быть идентифицированы известными способами, такими как созревание аффинности, последовательная модификация остатков CDR, сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез.

В других альтернативных вариантах антигенсвязывающий белок содержит домены тяжелой и легкой цепей, которые являются иммунологически активными гомологами или вариантами последовательностей доменов тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящей заявке. Соответственно, в некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит последовательность домена тяжелой или легкой цепи, которая аналогична, но не идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8-10. В некоторых случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи имеет идентичность последовательности 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 8-10, и указанный вариант является иммунологически активным.

В других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют данную аминокислоту другой аминокислотой с аналогичными характеристиками и дополнительно включают среди алифатических аминокислот обмен между остатками аланина, валина, лейцина и изолейцина; обмен между гидроксильными остатками серина и треонина, обмен между кислотными остатками аспартата и глутамата, замену между амидными остатками аспарагина и глутамина, обмен основных остатков лизина и аргинина и замены среди ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи включает замены, которые усиливают свойства CDR, такие как увеличение стабильности, устойчивости к протеазам и/или аффинности связывания с CD16A.

В других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи модифицируют для замены некритических остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые не являются критическими, могут быть идентифицированы известными способами, такими как созревание аффинности, последовательная модификация остатков CDR, сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению имеет период полувыведения короче, чем моноклональное антитело или любые другие форматы антител, использующие эквивалентные IgG домены для достижения периода полувыведения, сопоставимого с IgG, а также конструкции, использующие связывание HSA для продления своего периода полувыведения, в частности IgG.

"Период полувыведения" относится к периоду полувыведения, который представляет собой период, необходимый для того, чтобы концентрация антигенсвязывающего белка достигла половины его исход-

ного количества, измеренного в периферической крови человека для примененного пути введения (т.е. свободного антитела в сыворотке, в таких случаях, но не ограничиваясь перечисленными, как внутривенная инъекция или инфузия или подкожное применение).

В некоторых вариантах реализации период полувыведения антигенсвязывающего белка составляет менее одной недели, в частности, менее 72, 48, 42, 36, 24, 20, 12 или 6 ч. Такие короткие периоды полувыведения являются благоприятными для применения периодического введения, включая период без воздействия или период с уменьшенным воздействием согласно настоящему изобретению, поскольку период без воздействия в интервале между двумя последовательными и периодическими дозами антигенсвязывающего белка остается коротким.

Такой короткий период полувыведения, который значительно короче, чем период полувыведения моноклонального антитела, обеспечивает режим периодического введения в соответствии с настоящим изобретением, поскольку он позволяет обеспечить периоды с уменьшенным воздействием или периоды без воздействия после удаления антигенсвязывающего белка между двумя последовательными дозами антигенсвязывающего белка. Такие периоды с уменьшенным воздействием или периоды без воздействия антигенсвязывающего белка важны для восстановления NK-клеток. Используемый в настоящей заявке термин "уменьшенное воздействие" относится к количеству, т.е. концентрации в плазме, антигенсвязывающего белка, которое составляет менее половины исходного количества антигенсвязывающего белка, измеренного, как описано выше. Следовательно, термин "низкое воздействие" относится к количеству антигенсвязывающего белка, которое достигается после периода полувыведения антигенсвязывающего белка после его введения. Например, термин "уменьшенное воздействие" может относиться к количеству менее 40, 30, 20 и 15%, например, 15-40, 15-30 или 15-20% от первоначально введенной дозы антигенсвязывающего белка.

Используемый в настоящей заявке термин "свободный от воздействия" относится к количеству, т.е. концентрации в плазме, антигенсвязывающего белка, которое меньше, чем количество после, по меньшей мере, трех периодов полувыведения антигенсвязывающего белка, что соответствует 15% или менее от вводимой дозы антигенсвязывающего белка. Предпочтительно, "свободный от воздействия" относится к количеству, т.е. концентрации в плазме, антигенсвязывающего белка, которое меньше чем количество по меньшей мере после от 4 до 5 периодов полувыведения антигенсвязывающего белка. Предпочтительно "свободный от воздействия" относится к количеству, т.е. концентрации в плазме, антигенсвязывающего белка, которое составляет менее 10, 1 или 0,1% от введенной дозы антигенсвязывающего белка.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению со значительно более коротким периодом полувыведения, чем моноклональное антитело, может быть обеспечен за счет производных рекомбинантных антител с - по сравнению с моноклональными антителами - более низкими молекулярными массами.

Примеры антигенсвязывающих белков с коротким периодом полувыведения согласно настоящему изобретению включают не являющиеся IgG-подобными фрагменты антител или гибридные пептиды иммунологически функциональных участков иммуноглобулина, таких как, например, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, например, одноцепочечный Fv, тандемный одноцепочечный Fv ((scFv)₂), биспецифические молекулы, привлекающие клетки-киллеры (Bi-specific Killer Engagers; BiKE), триспецифические молекулы, привлекающие клетки-киллеры (Tri-specific Killer Engagers; TriKE), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (dual affinity retargeting antibodies, DARTTM), диатела (diabody, Db), одноцепочечные диатела (single chain diabody, scDb) и тандемные диатела (tandem diabody, TandAb®), а также нанотела или антигенсвязывающие белки, полученные методом Dock-and-lock (DNL); триатела, тритела. Антигенсвязывающие белки могут основываться по существу на доменах Fv или, альтернативно, также включать один или несколько константных доменов антител. В зависимости от желаемых характеристик, таких как валентность, мультиспецифичность, фармакокинетические и фармакодинамические свойства, Fv и/или константные домены и/или дополнительные функциональные домены могут быть модульно собраны в различных форматах или каркасах, таких, например, как описано в Brinkmann and Kontermann, mAbs., 2017, 9 (2): 182-192 или в Spiess et al., 2015, Molecular Immunology, 67: 95-106. Например, тандемные диатела, такие как тандемные диатела к CD30/CD16A, BCMA/CD16A или EGFR/CD16A, имеют период полувыведения менее 24, 22 или 20 ч, в то время как тандемный одноцепочечный Fv ((scFv)₂) имеет период полувыведения приблизительно 5, 4, 3 ч или, в частности, 2 ч.

Кроме того, связывающий белок может быть мультивалентным, т.е. содержит два или более участков связывания антигена. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для CD16A, т.е. связывает двухвалентно CD16A. В некоторых вариантах реализации связывающий белок содержит аминокислотную последовательность-метку для очистки.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок является мультиспецифичным и содержит, по меньшей мере, один дополнительный антигенсвязывающий участок, который связывается с антигеном-мишенью, отличным от CD16A, т.е. имеет вторую антигенную специфичность. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок может содержать по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для антигена-мишени.

"Антиген-мишень (целевой антиген)" обычно относится к антигену, связанному с участком, например, клетки или вируса, на который NK-клетка должна быть нацелена посредством антигенсвязывающего белка для стимуляции цитотоксичности NK-клеток. Примерами участков-мишеней могут быть опухолевые клетки или инфекционные агенты, такие как вирусные или бактериальные патогены, или паразиты, например, вирус денге, вирус простого герпеса, вирус гриппа, ВИЧ или клетки, несущие аутоиммунные мишени, аутоиммунный маркер или аутоиммунный антиген.

Антиген-мишень, отличный от CD16A, может быть выбран из бактериального вещества, вирусного белка, аутоиммунного маркера или опухолевого антигена.

В вариантах реализации, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген, опухолевый антиген может быть выбран из антигенов поверхности опухолевых клеток, например, специфичных опухолевых маркеров, или рестрицированного по МНС пептида, отображаемого молекулой класса МНС. Используемый в настоящей заявке термин "опухолевый антиген" включает антиген, связанный с опухолью (tumor associated antigen, TAA) и опухолеспецифичный антиген (tumor specific antigen, TSA). Термин "антиген поверхности опухолевых клеток" относится к любому антигену или его фрагменту, способному распознаваться антителом на поверхности опухолевой клетки.

Примеры антигенов-мишеней опухолевых клеток включают, но не ограничиваются перечисленными, CD5, CD19, CD20, CD30, CD33, матриксную металлопротеиназу 1 (MMP1), белок-предшественник рецептора ламинина, EGFR, EGFRvIII, BCMA, Ep-CAM, PLAP, антиген Thomsen-Friedenreich (TF), MUC-1 (муцин), IGFR, IL4-R альфа, IL13-R, FcεRI, IgE, VEGF, HER2/neu, HER3, PSMA, CEA, TAG-72, HPV E6, HPV E7, BING-4, Cyclin-B1, 9D7, EphA3, теломеразу, мезотелин, SAP-1, сурвивин, антиген рака яичка (семейство BAGE, семейство CAGE, семейство GAGE, семейство MAGE, семейство SAGE, семейство XAGE), NY-ESO-1/LAGE-1, PRAME, SSX-2, Melan-A/MART-1, Gp100/pmel17, тирозиназу, TRP-1/-2, MC1R, бета-катенин, BRCA1/2, CDK4, CML66, MART-2, p53, Ras, TGF-βRII и TCR (из Categories of Tumor Antigens, Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition, 2003). Другие опухолевые антигены описаны в Weinberg R, The Biology of Cancer, 2013.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок, который является мультиспецифичным, содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для антигена-мишени. В конкретных вариантах реализации антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для CD16A и по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для антигена-мишени. Такой антигенсвязывающий белок является по меньшей мере четырехвалентным.

В конкретном варианте реализации предложено биспецифичное и четырехвалентное тандемное диатело (tandem diabody, TandAb®). Тандемное диатело сконструировано путем объединения четырех переменных доменов тяжелых и легких цепей (VH и VL) из двух или более различных доменов Fv в одном полипептиде. Эти домены расположены таким образом, что соответствующие VH и VL могут объединиться, когда две молекулы полипептида выравниваются в формате "голова к хвосту". Короткие линкеры между доменами (двенадцать или менее аминокислот) предотвращают внутримолекулярное спаривание Fv. Тандемное диатело и его получение описаны в Weichel et al., 2015; Kirpryanov SM, 2009 или Kirpryanov SM, 2003.

В примерах в качестве примера приведено биспецифичное и четырехвалентное CDM/CD16A тандемное диатело AFM13, обладающее специфичностью к CD30 и CD16A (тандемное диатело к CD30/CD16A), которое было описано в Reusch et al., 2014. Данное тандемное диатело CD30/CD16A специфично рекрутирует NK-клетки, связываясь исключительно с изоформой CD16A. Описанное в настоящей заявке биспецифичное тандемное диатело к CD30 и CD16A предназначено для обеспечения специфичного нацеливания на опухолевые клетки CD30⁺ путем рекрутирования цитотоксических NK-клеток. В таком тандемном диателе длина линкера такова, что он предотвращает внутримолекулярное спаривание переменных доменов, так что молекула не может укладываться обратно на себя, образуя одноцепочечное диатело, а скорее вынуждена спариваться с комплементарными доменами другой цепи. Домены также расположены таким образом, что соответствующие домены VH и VL образуют пары во время этой димеризации. После экспрессии из одной генной конструкции две идентичные полипептидные цепи складываются голова к хвосту, образуя функциональный нековалентный гомодимер приблизительно в 105 кДа. Несмотря на отсутствие межмолекулярных ковалентных связей, гомодимер является очень стабильным после образования, остается интактным и не возвращается обратно в мономерную форму.

Тандемные диатела содержат только переменные домены антител и поэтому предполагают отсутствие побочных эффектов или неспецифичных взаимодействий, которые могут быть связаны с Fc фрагментом. Например, Fc-рецепторы обнаруживаются на многочисленных типах клеток, таких как лейкоциты или клетки Купфера, которые могут связываться с Fc-гамма. Поскольку тандемные диатела допускают двухвалентное связывание с каждым из антигенов-мишеней, например, CD30 и CD16A, avidность такая же, как у IgG. Размер тандемного диатела составляет приблизительно 105 кДа, меньше, чем у IgG, что может способствовать усиленному проникновению в опухоль. Тем не менее, этот размер намного выше порога для первого прохождения почечного клиренса, предлагая фармакокинетическое преимущество по сравнению с более маленькими биспецифичными форматами, основанными на связывающих

антитело доменах или каркасах без антител. Период полувыведения тандемного диатела, такого как тандемного диатела AFM13 к CD30/CD16A, составляет приблизительно 19 ч. Тандемные диатела хорошо экспрессируются в клетках-хозяевах, например, в клетках млекопитающих СНО. Предполагается, что для тандемных диател доступен надежный предварительный и последующий процесс производства.

"Периодическое" введение, как используется в настоящей заявке, представляет собой способ введения антигенсвязывающего белка с интервалами, в частности с регулярными интервалами. Следовательно, вводят первую дозу антигенсвязывающего белка, и вторую дозу антигенсвязывающего белка вводят после первой дозы. Предпочтительно интервал введения первой и второй дозы повторяют несколько раз за один цикл лечения. Интервал между двумя последовательными дозами антигенсвязывающего белка выбирают таким образом, чтобы воздействие антигенсвязывающей молекулы на основе фармакокинетических характеристик, например, периода полувыведения антигенсвязывающего белка, было периодическим, что позволяет обеспечить, по меньшей мере, период с уменьшенным воздействием или предпочтительно обеспечить период без воздействия между двумя последовательными дозами. Воздействие антигенсвязывающего белка против CD16A может временно снизить активность NK-клеток. Для эффективного восстановления цитотоксичности NK-клеток важно, чтобы воздействие, т.е. концентрация антигенсвязывающего белка против CD16A, оставалось низким или отсутствовало во время фазы восстановления. Следовательно, интервал выбирают таким образом, чтобы его период был больше, чем период полувыведения антигенсвязывающего белка, для обеспечения того, чтобы интервал содержал период с уменьшенным воздействием или период, свободный от воздействия, после того, как антигенсвязывающий белок был в основном удален.

Следовательно, интервал периодического введения кратен периоду полувыведения антигенсвязывающего белка.

В некоторых вариантах реализации интервал может быть, по меньшей мере, на один день длиннее периода полувыведения антигенсвязывающего белка.

В некоторых вариантах реализации этот интервал по меньшей мере в три раза превышает период полувыведения антигенсвязывающего белка. Например, интервал может быть от по меньшей мере трех, до по меньшей мере пяти раз длиннее, чем период полувыведения антигенсвязывающего белка, например, по меньшей мере в 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз. В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок против CD16A считается разбавленным или отсутствующим после интервала по меньшей мере в 3 раза, предпочтительно от 4 до 5 раз длиннее, чем период его полувыведения.

В некоторых вариантах реализации интервал между двумя последовательными дозами антигенсвязывающего белка против CD16A может составлять, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней, причем интервал зависит от периода полувыведения антигенсвязывающего белка, и указанный интервал выбирают таким образом, чтобы он содержал период с уменьшенным воздействием или свободный от воздействия антигенсвязывающего белка период. В конкретных вариантах реализации антигенсвязывающий белок вводят периодически в циклах дозирования последовательных доз, т.е. первой дозы и последующей второй дозы, где интервал между двумя последовательными дозами составляет по меньшей мере 3 дня.

Предпочтительно цикл дозирования, включающий в себя первую и последующую вторую дозу антигенсвязывающего белка, повторяют многократно, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раз, до завершения желаемого цикла лечения и/или до тех пор, пока диагностируется прогрессирование заболевания и/или до тех пор, пока не будет достигнута заранее определенная клиническая конечная точка, например, 4 или 8 недель, или 6 месяцев.

В настоящем изобретении предложен способ, включающий стадию периодического введения антигенсвязывающего белка против CD16A, согласно настоящей заявке, и дополнительную стадию введения по меньшей мере одного цитокина. Следовательно, в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий белок против CD16A, как описано в настоящей заявке, для применения в иммунотерапии на основе NK-клеток, где антигенсвязывающий белок против CD16A вводят периодически и, дополнительно, вводят по меньшей мере один цитокин.

Цитокин представляет собой цитокин, активирующий NK-клетки, и может быть выбран из семейства интерлейкинов. Используемый в настоящей заявке термин "цитокин" следует понимать как отдельный вид цитокинов или комбинацию различных видов цитокинов, где комбинацию цитокинов можно вводить одновременно, отдельно или последовательно. Следовательно, цитокин можно вводить до, одновременно или после введения дозы антигенсвязывающего белка. Это включает многократные повторные дозы цитокинов до или после введения антигенсвязывающего белка. Хотя антигенсвязывающий белок должен вводиться периодически, цитокин можно вводить непрерывно или периодически. В последних вариантах реализации антигенсвязывающий белок и цитокин можно вводить периодически. В вариантах реализации, в которых антигенсвязывающий белок и цитокин вводят периодически, время и интервал введения антигенсвязывающего белка и цитокина могут быть различными; следовательно, антигенсвязывающий белок и цитокин не вводят одновременно.

Таким образом, цитокин можно вводить после каждого введения антигенсвязывающего белка, или цикл двух или более последующих введений цитокина может следовать за введением антигенсвязываю-

шего белка. Например, количество активированных НК-клеток можно увеличить введением низкой дозы IL-2 после предварительной обработки антигенсвязывающим белком.

Например, цитокин может быть выбран из группы, состоящей из интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 12 (IL-12), интерлейкина 15 (IL-15), интерлейкина 18 (IL-18), интерлейкина 21 (IL-21) или их комбинации. В конкретных вариантах реализации цитокин представляет собой IL-2 или IL-15 или комбинацию IL-12, IL-15 и IL-18, в частности комбинацию IL-2 и IL-15. Предпочтительно IL-2 вводят в "низкой дозе". Подходящая низкая доза IL-2 составляет приблизительно менее чем 6,0 миллионов единиц/м²/день подкожно (Lissoni P; 1993; Romee et al., 2016).

Введение IL-2 в низкой дозе снижает риск нежелательных побочных эффектов IL-2, таких как активация регуляторных Т-клеток, и увеличивает количество активных НК-клеток, тем самым повышая терапевтическую эффективность у пациента. Интерлейкины для активации НК-клеток рассмотрены в Romee, R et al., 2014.

Термин "цитокин" также относится к композициям и/или агентам, содержащим цитокин, для обеспечения усиленной опосредуемой цитокинами иммунной функции. Такие агенты были разработаны для дальнейшего снижения побочных эффектов и изменения распределения и/или фармакокинетики введения цитокинов. Например, цитокины обеспечивают в комплексах с повышенной биологической активностью и увеличенным периодом полувыведения. Такие комплексы можно вводить в режиме дозирования, аналогичном таковому у антител, например, один раз в неделю. Примерами таких комплексов цитокинов, которые можно применять в качестве цитокинов согласно данному изобретению, являются NKTR-214, биологическое пролекарственное средство, содержащее IL-2, связанный с цепями ПЭГ (Charych, D. et al., 2016), NKTR-255, биологическое пролекарственное средство, содержащее IL-15, связанный с цепями PEG (Nektar Therapeutics, Сан-Франциско, США) или ALT-803, мультимерный комплекс, сконструированный путем слияния суперантагониста IL-15 (IL-15N72D) с внеклеточными суши-доменом IL-15Ra (IL-15RaSu) (Liu, B et al., 2016).

В конкретном варианте реализации предложен мультиспецифичный, например, биспецифичный, антигенсвязывающий белок, который двухвалентно связывается с CD16A для применения в иммунотерапии, например, иммунотерапии на основе НК-клеток, где антигенсвязывающий белок вводят субъекту периодически. Например, этот антигенсвязывающий белок может представлять собой тандемное диатело, такое как, например, тандемное диатело к CD30/CD16A, EGFR/CD16A или BCMA/CD16A.

В других вариантах реализации антигенсвязывающий белок, который связывается с CD16A, предназначен для введения субъекту периодически и в комбинации с цитокином. Цитокин можно вводить попеременно с антигенсвязывающим белком или непрерывно с повторными, т.е. прерывистыми, дозами антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах реализации период или интервал между первой дозой антигенсвязывающего белка и последующей дозой цитокина можно регулировать с учетом элиминации (периода полувыведения) антигенсвязывающего белка. Следовательно, в таких вариантах реализации дозу цитокина следует вводить после того, как большая часть антигенсвязывающего белка была удалена и период полувыведения антигенсвязывающего белка закончился. Введение цитокина направлено на рестимуляцию НК-клеток после воздействия антигенсвязывающего белка. Следовательно, дозу цитокина следует вводить после того, как антигенсвязывающий белок в значительной степени удален.

Следовательно, антигенсвязывающий белок, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий участок для CD16A для применения в иммунотерапии на основе НК-клеток, можно вводить периодически в цикле дозирования, включающем стадии:

- (a) введения первой дозы антигенсвязывающего белка против CD16A; и
- (b) введения второй дозы антигенсвязывающего белка против CD16A; и

цикл дозирования дополнительно включает введение по меньшей мере одного цитокина, т.е. стадию (c) введения дозы по меньшей мере одного цитокина в течение интервала от этапа (a) до этапа (b). Предпочтительно, вторую дозу антигенсвязывающего белка против CD16A вводят после стадии (a) после, по меньшей мере, трехкратного превышения периода полувыведения антигенсвязывающего белка.

В конкретных вариантах реализации, где цитокин вводят после дозы антигенсвязывающего белка, цитокин вводят по меньшей мере через 20 ч после первой дозы антигенсвязывающего белка. Следовательно, цитокин может быть введен - в зависимости от периода полувыведения антигенсвязывающего белка - по меньшей мере через 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 70, 80, 90 или 100 ч после первой дозы антигенсвязывающего белка. В конкретных вариантах реализации, где антигенсвязывающий белок представляет собой тандемное диатело и желателен период без воздействия, цитокин можно вводить, по меньшей мере, приблизительно через 80-100 ч после первой дозы тандемного диатела. В других вариантах реализации цитокин можно вводить приблизительно через 20-36 ч после первой дозы тандемного диатела, воздействие которого уже снижено в это время.

Например, антигенсвязывающий белок и цитокин должны предназначены для введения в цикле дозирования, включающем стадии:

- (a) введения первой дозы антигенсвязывающего белка;
- (b) введения по меньшей мере одного цитокина после стадии (a); а также
- (c) введения второй дозы антигенсвязывающего белка после стадии (b).

Этот цикл дозирования может повторяться, предпочтительно, по меньшей мере, до тех пор, пока не будет диагностировано прогрессирование заболевания и/или не будет достигнута желаемая клиническая конечная точка.

Интервал между двумя последовательными введениями антигенсвязывающего белка (этапы (а) и (с)) предназначен для повторной стимуляции активности НК-клеток. В некоторых вариантах реализации время введения цитокина на этапе (b) наступает по меньшей мере, после периода полувыведения первой дозы антигенсвязывающего белка на этапе (а).

Короткий период полувыведения антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, гарантирует применение режима периодического введения. Для повторной стимуляции НК-клеток следующей дозой цитокина необходимо, чтобы предыдущая доза антигенсвязывающего белка была в значительной степени устранена, чтобы НК-клетки больше не подвергались воздействию антигенсвязывающего белка. Следовательно, применение антигенсвязывающего белка, имеющего период полувыведения менее 48 ч, в частности менее 24 ч, обеспечивает режим периодического введения, описанный в настоящей заявке. Период полувыведения тандемного диатела, такого как CD30/CD16A тандемное диатело AFM13, описанного в настоящей заявке, у людей составляет приблизительно 19 ч (Rothe, et al., 2015). Следовательно, согласно изобретению, дозу цитокина можно вводить, по меньшей мере, через 19 ч, например, через 20 ч, после введения первой дозы тандемного диатела CD30/CD16A. Альтернативно, могут быть использованы другие антигенсвязывающие форматы, например, такие как фрагменты антител или одноцепочечные или мультицепочечные Fv конструкции, которые имеют период полувыведения менее 19 ч. Альтернативно, цитокин может вводиться до или одновременно с дозой антигенсвязывающего белка, или цитокин может вводиться непрерывно. Следовательно, цитокин может присутствовать в фоновом режиме во время воздействия антигенсвязывающего белка против CD16A. Однако для восстановления цитотоксичности НК-клеток необходимо, чтобы цикл дозирования между (а) первой дозой антигенсвязывающего белка и (b) второй дозой антигенсвязывающего белка также включал соответствующее уменьшение или предпочтительно свободный период по существу без антигенсвязывающего белка.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифичное и четырехвалентное тандемное диатело, т.е. тандемное CD40/CD16A антитело, например, AFM13 (Reusch, et. Al., 2014). В этих вариантах реализации тандемное диатело CD30/CD16A используется для лечения CD30+ рака, например, лимфомы Ходжкина.

Следовательно, в настоящей заявке предложены некоторые медицинские применения и способы, в которых антигенсвязывающий белок, специфичный для CD30 и CD16A, например, тандемное антитело к CD30/CD16A, как описано в настоящей заявке выше, вводят в эффективной дозе субъекту для лечения CD30+ рака, например, лимфомы Ходжкина и подобных заболеваний. Лимфома Ходжкина включает недавно диагностированную, рецидивирующую, повторяющуюся или рефрактерную лимфому Ходжкина.

Описанный в настоящей заявке новый режим периодического дозирования используют в иммунотерапевтическом подходе, включающем опосредованное антителами привлечение НК-клеток. Такая иммунотерапия на основе НК-клеток может быть применена для лечения опухолей, аутоиммунных заболеваний или вирусных инфекций.

Терапия НК-клетками в соответствии с настоящим изобретением может включать стадию стимуляции НК-клеток *ex vivo*. Для этой стадии либо аутологичные НК-клетки могут быть собраны у подлежащего лечению субъекта, либо аллогенные НК-клетки могут быть собраны у донора. Источниками аллогенных НК-клеток могут быть мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), пуповинная кровь, дифференцировка стволовых клеток или "готовые" линии НК-клеток (например, клеточная линия NK-92 и ее производные).

После выделения НК-клетки размножают *ex vivo* в соответствии с описанными протоколами, которые включают стимуляцию фидерными клетками, коктейли цитокинов, например, включающие IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и их комбинации. После инфузии указанные размноженные клетки обрабатывают поддерживающими низкими дозами IL-2, IL-15 (Koehl et al., 2016 и Romee et al., 2016) или суперагонистами, такими как Altog-803. Сопоставимую процедуру применяют к аутологичным НК-клеткам. Клинический результат такого адоптивного переноса НК-клеток может быть улучшен нацеливанием на опухоль с помощью мишень-специфичных антигенсвязывающих белков НК-клеток. Ожидается, что эффекты антигенсвязывающего белка против CD16A будут эквивалентны для эндогенных и адоптивно перенесенных (аутологичных и аллогенных) НК-клеток.

Введение осуществляют различными способами, например, внутривенным, внутривентральным, подкожным, внутримышечным, местным или внутрикожным введением. Дозировка связывающего белка и интерлейкина будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозировка для любого отдельного субъекта зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, которое следует вводить, время и способ введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные средства. "Эффективная доза" относится к количествам активного ингредиента, которые являются достаточными для воздействия на течение и тяжесть заболевания, что приводит к снижению или ремиссии такой патологии. "Эффективная доза", применяемая для лечения и/или профилактики лимфомы Ходжкина, может быть

определена с использованием известных способов.

Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют описанные варианты реализации, не ограничивая объем настоящего изобретения.

Пример 1.

Выделение и культивирование NK-клеток PBMC выделяли из лейкоцитарных слоев здоровых взрослых доноров (Blutbank Mannheim, Germany) с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Нураque (плотность 1,077, Biochrom, VWR) или градиенте плотности Lymphoprep (Stem Cell Technologies, cat: 07861). NK-клетки выделяли из PBMC путем отрицательной селекции с использованием "Human NK cell Isolation Kit" (Miltenyi Biotec) или "MojoSort™ Human NK cell Isolation Kit" (Biolegend) с использованием разделительных колонок LS (Miltenyi Biotec). Для обеднения PBMC в отношении NK-клеток (PBMC ΔNK) использовали CD56 MicroBeads для положительного отбора (Miltenyi Biotec). Свежевыделенные NK-клетки, далее называемые "наивными", выдерживали в течение ночи в среде SCGM (CellGenix), содержащей 10% сыворотки человека (Invitrogen); PBMC и PBMC ΔNK в полной среде RPMI.

В качестве альтернативы, выделенные PBMC культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FCS (Invitrogen, 10270-106) в течение ночи. Для обогащения NK-клеток PBMC собирали из ночных культур и использовали для одного раунда отрицательного отбора с использованием EasySep™ Human NK-Cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies, cat.: 17955).

Активация NK-клеток тандемным диателом (CD30/CD16A, EGFR/CD16A или BCMA/CD16A) NK-клетки совместно культивировали с CD30+ клетками Karpas-299 или L428 в соотношении 1:1 (каждых 1×10^6 клеток) в 24-луночных планшетах в присутствии AFM13 (CD30/CD16A) или AFM12 (CD19/CD16A) в концентрации 0,1-1 мкг/мл в течение 20 ч в полной среде RPMI. В качестве альтернативы, NK-клетки культивировали в 24-луночных планшетах (не обработанных для тканевой культуры), покрытых 0,5 мкг/лунку (10 мкг/мл на 0,5 мл PBS, покрытых в течение ночи) AFM13, ритуксимабом (MabThera; Roche), тандемным диателом к EGFR/CD16A, тандемным диателом к BCMA/CD16A или IgG1 мыши (не взаимодействующим с CD16A человека; Biolegend) в PBS в течение 20 ч. Когда указано, NK-клетки обрабатывали IL-2 (12,5-400 Ед/мл, NIH или Sigma), IL-15 (0,6-10 нг/мл, Peprotech) или комбинацией IL-12 (10 нг/мл, Peprotech), IL-15 (20 нг/мл) и IL-18 (100 нг/мл, MBL), далее именуемой IL-12/15/18, и культивировали в полной среде SCGM в течение 2-5 дней.

Пролиферация NK-клеток и их количество.

Культуры NK-клеток загружали 2 мкМ (Sigma-Aldrich), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте и затем промывали в 5 мл чистой FCS и 5 мл среды RPMI. Затем NK-клетки культивировали с однократной дозой IL-2 (12,5-400 ед/мл) или IL-15 (0,6-10 нг/мл) при низкой плотности клеток $0,5 \times 10^6$ мл в 24-луночных планшетах в полной среде SCGM в течение 3-7 дней. Экспрессию CFSE измеряли проточной цитометрией. Разведение CFSE определяли количественно путем расчета процентного содержания NK-клеток, которые подвергались ≥ 4 делениям, исходя из пиков разбавления CFSE. Абсолютное количество NK-клеток для оценки экспансии NK-клеток было получено путем подсчета клеток, отрицательных по трипановому синему, и клеток, гейтированных как живые клетки, с помощью микроскопии и проточной цитометрии (относительно микрошариков для подсчета), соответственно.

Анализ высвобождения ^{51}Cr , дегрануляции и IFN- γ .

В анализе высвобождения ^{51}Cr NK-клетки совместно культивировали в течение 4 ч с ^{51}Cr -мечеными клетками-мишенями в присутствии тандемного диатела AFM13, AFM12, EGFR/CD16A, тандемного диатела к BCMA/CD16A или химерного антитела IgG против CD30. Для дегрануляции и внутриклеточной экспрессии IFN- γ NK-клетки совместно культивировали без/с клетками-мишенями в соотношении 1:1 (каждых по 5×10^4 клеток), антителами, IL-12/15/18 или PMA (50 нг/мл) с иономицином (1 мМ) в круглодонных 96-луночных планшетах в течение 4 ч в присутствии анти-CD107a-PE (Biolegend) и GolgiPlug (1/100 об./об., BD Bioscience). Внеклеточную экспрессию CD107a (маркер дегрануляции) и внутриклеточную экспрессию IFN- γ измеряли с помощью проточной цитометрии.

Секрецию IFN- γ в супернатанты клеток анализировали после 24-часового совместного культивирования NK-клеток с опухолевыми клетками (соотношение 1:1) или IL-12/15 с использованием набора к IFN- γ человека "ELISA MAX" (Biolegend).

Исследования цитотоксичности с высвобождением кальцеина в течение 4 ч.

Для анализов цитотоксичности с выделением кальцеина указанные клетки-мишени собирали из культуры, промывали средой RPMI 1640 без FCS и мегили 10 мкМ кальцеином AM (Invitrogen/Molecular Probes, cat.: C3100MP) в течение 30 мин в среде RPMI без FCS при 37°C. После промывки меченые клетки ресуспендировали в полной среде RPMI (среда RPMI 1640, дополненная 10% инактивируемой нагреванием FCS, 4 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина G натриевой соли, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина). 1×10^4 клеток-мишеней высевали вместе с первичными NK-клетками человека в соотношении E:T 2,5:1 и указанными антителами в отдельных лунках круглодонного 96-луночного микропланшета в общем объеме 200 мкл/лунка в двух повторностях. Спонтанное высвобождение, максимальное высвобо-

ждение и уничтожение мишеней эффекторами в отсутствие антител определяли в четырех повторностях на каждом планшете.

После центрифугирования в течение 2 мин при 200 g пробу инкубировали в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. 100 мкл супернатанта клеточной культуры собирали из каждой лунки после дополнительного центрифугирования в течение 5 мин при 500 g, и флуоресценцию высвобожденного кальцеина измеряли при 520 нм с использованием флуоресцентного планшет-ридера (EnSight Perkin Elmer). На основании измеренных подсчетов специфичный лизис клеток рассчитывали по следующей формуле: [флуоресценция (образец)-флуоресценция (спонтанная)]/[флуоресценция (максимальная) - флуоресценция (спонтанная)]×100%. Флуоресценция (спонтанная) представляет количество флуоресценции от клеток-мишеней в отсутствие эффекторных клеток и антител, а флуоресценция (максимальная) представляет общий лизис клеток, вызванный добавлением Тритона X-100.

Проточная цитометрия.

Внутриклеточное окрашивание IFN-γ и перфорина/гранзима В проводили после внеклеточного окрашивания с использованием набора "FoxP3 Staining Buffer Set" (eBiosciences) и набора "Cytofix/Cytoperm" (BD Bioscience), соответственно. Образцы получали с помощью FACS Calibur или Canto II (BD Bioscience) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo 10 (FlowJo LLC).

Экспрессию поверхностных маркеров на NK-клетках определяли с использованием CD45 PerCpCy5. 5 (BD Bioscience; 558411), CD16 BV421 (BioLegend; 302038), CD56 PC7 (Beckman Coulter; A21692) и фиксируемого красителя жизнеспособности eF780 (eBioscience; 65-0864-14). Образцы были получены на CytoFLEX S (Beckman Coulter) и проанализированы с использованием программного обеспечения CytExpert 2. 1.

Пример 2.

Тандемное диатело к CD30/CD16A (AFM13) индуцирует функциональную и фенотипическую активацию NK-клеток в ответ на CD30+ клетки лимфомы.

Наличие биспецифичного четырехвалентного тандемного диатела AFM13 (CD30/CD16A) значительно улучшало цитотоксическую активность свежeweделенных NK-клеток в отношении CD30+ линий раковых клеток классической лимфомы Ходжкина, анапластической крупноклеточной лимфомы и неходжкинской лимфомы в 4-часовых исследованиях высвобождения ⁵¹Cr (фиг. 1, А). Данный эффект был особенно явно выражен в отношении CD30+ опухолевых клеток, устойчивых к наивным NK-клеткам. Напротив, лизис CD30- клеток не изменялся в случае тандемного диатела AFM13, в то время как лизис CD19+ CD30- клеток Daudi мог быть увеличен тандемным диателом AFM12 (CD19/CD16A). Тандемное диатело AFM13 было эффективно при низких концентрациях от 10⁻³ мкг/мл и было на несколько порядков более эффективно, чем обычное IgG1 антитело к CD30 (фиг. 1, С). В целом, процент AFM13-опосредованного лизиса был сопоставим между выделенными NK-клетками и РВМС при соответственных соотношениях NK-клеток и мишеней, тогда как обедненные по NK-клеткам РВМС были неспособны индуцировать лизис опухолевых клеток (фиг. 1, D).

Опосредованную AFM13 цитотоксичность NK-клеток можно усилить путем 2-дневной предварительной активации NK-клеток IL-2, IL-15 или IL12/15/18, особенно в отношении опухолевых клеток, слабо восприимчивых к активированным цитокинами NK-клеткам. Интересно, что взаимодействие NK-клеток с опсонизированными AFM13 клетками-мишенями индуцировало лизис находившихся рядом неопсонизированных опухолевых CD30+ клеток (но не CD30-), что не наблюдали после взаимодействия с K562 или опсонизированными цетуксимабом клетками-мишенями, которые в высокой степени активируют NK-клетки.

Таким образом, для лизиса находящихся рядом опухолевых клеток CD30+ строго требовалось тандемное диатело AFM13 и, вероятно, это происходило из-за остаточного тандемного диатела AFM13, связанного с CD16A на NK-клетках.

Пример 3.

Предварительная активация тандемного диатела к CD30/CD16A (AFM13) через CD16A усиливает пролиферацию NK-клеток в ответ на IL-15 или низкую дозу IL-2.

В ответ на AFM13-опсонизированные опухолевые клетки, повышение экспрессии CD25 (IL-2Rα) и CD132 (IL-2Rγ) на NK-клетках предполагало улучшение IL-2-зависимых функций. Таким образом, предварительная активация AFM13 усиливала IL-2-зависимую пролиферацию NK-клеток. Меченные CFSE NK-клетки инкубировали в системе без опухолевых клеток на AFM13 в виде покрытия в течение 20 ч, переносили и инкубировали с IL-2 в течение 3-7 дней (фиг. 2, А). При применяемой низкой плотности клеток одни цитокины являются слабым стимулом для пролиферации NK-клеток. Аналогично ответу на опсонизированные AFM13 опухолевые клетки, воздействие AFM13 в виде покрытия приводило к повышению экспрессии регуляции CD25 и CD 132 на NK-клетках, в то время как экспрессия CD122 (IL-2Rβ) оставалась неизменной (фиг. 2, В). Примечательно, что предварительно активированные тандемным диателом AFM13 NK-клетки демонстрировали выраженное разбавление CFSE после культивирования в IL-2, которое стало наиболее очевидным на 5-й день и далее увеличивалось до 7-го дня (фиг. 2, С). Напротив, NK-клетки, которые ранее не подвергались воздействию тандемного диатела AFM13 или раствори-

мого тандемного диатела AFM13, демонстрировали значительно меньшее разведение CFSE (фиг. 2, С; данные не показаны). Процент НК-клеток, которые прошли по крайней мере четыре деления, был значительно выше среди предварительно AFM13-активированных НК-клеток, что указывает на повышенную IL-2-опосредованную пролиферацию после воздействия тандемного диатела AFM13 (фиг. 2, D). Аналогичные результаты были получены после воздействия ритуксимаба, связывающего CD16A через его человеческую Fc-часть.

Затем было оценено, влияет ли AFM13-опосредованная предварительная активация на чувствительность к низким дозам IL-2. Фактически, даже при низкой концентрации, составляющей 50 ед/мл, НК-клетки, предварительно активированные AFM13, показали сопоставимое выраженное разведение CFSE как и при более высокой дозе в 400 ед/мл, в то время как минимальная концентрация для усиления пролиферации составляла 25 ед/мл. (фиг. 2, E). Кроме того, абсолютные количества НК-клеток были существенно увеличены после культивирования в низких и высоких дозах IL-2, что приводило к 4-кратному увеличению числа НК-клеток. Подобным образом, IL-15-опосредованная пролиферация НК-клеток и абсолютное количество НК-клеток были увеличены после предварительной активации AFM13; однако этот эффект в основном наблюдался при самой высокой протестированной дозе IL-15 (10 нг/мл) (фиг. 2, F).

Следовательно, взаимодействие с CD16A наивных НК-клеток тандемным диателом AFM13 или ритуксимабом приводило к повышению экспрессии CD25 и CD132, что приводило к усилению чувствительности НК-клеток к IL-15 и низким дозам IL-2, которые усиливали IL-2 и IL-15-опосредованную пролиферацию НК-клеток.

Пример 4.

Восстановление CD16A-опосредованной функции НК-клеток после воздействия тандемного диатела к CD30/CD16A (AFM13).

Одновременно с индукцией маркеров активации мы наблюдали почти полную потерю экспрессии CD16 на НК-клетках после 20-часового культивирования с опсонизированными AFM13 клетками-мишенями или AFM13 в виде покрытия (фиг. 3, A-C). Важно отметить, что этот эффект был временным, так как экспрессия CD16 могла быть восстановлена, когда НК-клетки были пересеяны после воздействия тандемного диатела AFM13 и впоследствии культивированы при низких или высоких дозах IL-2 или IL-15 в течение 5 дней (фиг. 3, C). Снижение экспрессии CD16, наблюдаемое с помощью проточной цитометрии, не было связано с маскированием эпитопа, так как обнаружение CD16 антителом 3G8 к CD16 не изменялось в присутствии AFM13. Вместо этого снижение экспрессии CD16 основывалось, по меньшей мере, частично на опосредованном металлопротеиназой расщеплении, о чем ранее сообщали в отношении снижения экспрессии CD16 с помощью антитела 3G8 к CD16, ритуксимаба и ViKEs (Borrego, et al., 1994, Mota, et al., 2004, Romee, et al., 2013, Wiernik, et al., 2013).

Затем, временное снижение CD16 после воздействия тандемного диатела AFM13, повлиявшее на цитотоксичность НК-клеток, было протестировано в последующем втором воздействии. Действительно, после совместного культивирования с L428 клетками в присутствии тандемного диатела AFM13, лизис новой порции AFM13-опсонизированных клеток-мишеней (второе воздействие) был нарушен по сравнению с лизисом с помощью ранее совместно не культивированных НК-клеток. Цитотоксичность НК-клеток оставалась неизменной после совместного культивирования с клетками L428 в присутствии тандемного диатела AFM12. Для того чтобы изучить эту нарушенную цитотоксическую функцию в системе без опухолевых клеток, цитотоксичность НК-клеток оценивали после взаимодействия с тандемным диателом AFM13 в виде покрытия. Цитотоксичность, дегрануляция и внутриклеточная экспрессия IFN- γ НК-клеток в ответ на опсонизированные AFM13 клетки Karpas-299 была значительно снижена после 20-часового культивирования на тандемном диателе AFM13 в виде покрытия, несмотря на неизменные уровни перфорина и гранзима B (фиг. 3, D-E; фиг. 4, A). Аналогично, лизис AFM13-опсонизированных L428 и AFM12-опсонизированных клеток Daudi был нарушен (фиг. S4, C). Тем не менее, остаточный AFM13-опосредованный лизис был выше, чем лизис неопсонизированных опухолевых клеток. Важно отметить, что сниженная цитотоксичность НК-клеток после воздействия тандемного диатела AFM13 может быть полностью восстановлена после последующего культивирования в IL-2 или IL-15 в течение 5 дней (фиг. 3, D). Аналогичным образом, ритуксимаб в виде покрытия нарушал экспрессию CD16 и цитотоксичность НК-клеток, которые могли быть восстановлены после культивирования в IL-2.

Максимальный уровень дегрануляции и внутриклеточной экспрессии IFN- γ , индуцируемой РМА/иономицином, также снижался после воздействия тандемного диатела AFM13, что свидетельствует о более широкой дисфункции. Фактически, также была нарушена CD16A-независимая "естественная" цитотоксичность НК-клеток, дегрануляция и внутриклеточная экспрессия IFN- γ в ответ на прототипную линию клеток-мишеней K562, а также клетки HuT-78 после воздействия тандемного диатела AFM13. (фиг. 3, F; фиг. 4, B). Данное ингибирование может быть отменено последующим культивированием в IL-2 в течение пяти дней. Примечательно, что экспрессия IFN- γ в ответ на IL-12/15/18 оставалась неизменной и умеренно увеличивалась после воздействия тандемного диатела AFM13, что совпало с повышенной экспрессией высокоаффинных рецепторов IL-12R β 2 и IL-18R α (фиг. 4, C-D). Таким образом,

предварительно активированные AFM13 НК-клетки оказались более чувствительными не только к IL-2 и IL-15, но также к IL-12 и IL-18.

Следовательно, в то время как функциональность НК-клеток была повышена напрямую в ответ на опсонизированные AFM13 клетки-мишени, воздействие тандемного диатела AFM13 впоследствии приводило к селективной временной дисфункции в отношении второго воздействия на опухолевые клетки, которое могло быть восстановлено стимуляцией IL-2 или IL-15.

На фиг. 6 показано, что после восстановления цитокинами цитотоксического потенциала НК-клеток повторное воздействие AFM13 снова снижает цитотоксичность НК-клеток. Снижение цитотоксической активности после 2-го воздействия AFM13 сравнимо с таковым после 1-го воздействия. Эти данные показывают, что в присутствии AFM13 стимуляция цитокинами не может (по крайней мере, не полностью) обратить временную потерю активности НК-клеток, индуцированную AFM13. Таким образом, для эффективного стимулированного цитокинами восстановления цитотоксичности НК-клеток важно, чтобы концентрация антигенсвязывающего белка против CD16A оставалась низкой или отсутствовала во время фазы восстановления.

Пример 5.

Предварительная активация тандемным диателом CD30/CD16A (AFM13) за счет CD16A приводит к интенсивной продукции IFN- γ НК-клетками.

Было определено, может ли предварительная активация тандемным диателом AFM13 модулировать продукцию IFN- γ НК-клетками, культивируемыми в IL-2, при повторной стимуляции в отсутствие тандемного диатела AFM13. В ответ на IL-12/15, продукция IFN- γ была значительно повышена, когда культивируемые в IL-2 НК-клетки первоначально подвергали воздействию AFM13 (фиг. 5, А). Что еще более поразительно, продукция IFN- γ дополнительно усиливалась в ответ на рестимуляцию клетками K562 или L428 (фиг. 5, А), что указывает на то, что предварительная активация тандемным диателом AFM13 усиливала IFN- γ ответ на цитокины и клетки лимфомы.

Предварительная активация тандемным диателом к CD30/CD16A (AFM13) за счет CD16A вызывает лизис CD30⁺ и даже CD30⁻ клеток лимфомы.

Показано, что культивирование в IL-2 после воздействия тандемного диатела AFM13 полностью восстановило цитотоксичность НК-клеток (фиг. 3, D+F). Следовательно, AFM13-опытные НК-клетки имели одинаково сильный ответ на второе воздействие опсонизированной AFM13 мишени, как и НК-клетки, культивируемые только в IL-2. На следующем этапе было изучено, может ли предварительная активация тандемным диателом AFM13 влиять на "естественный" лизис в ответ на второе воздействие (не опсонизированных) CD30⁺ или CD30⁻ клеток лимфомы, практически устойчивых к культивируемым в течение 5 дней с IL-2 НК-клеткам. Примечательно, что лизис CD30⁺ клеток Каграс-299 и HDLM-2 усиливался, когда культивируемые с IL-2 или IL-15 НК-клетки первоначально подвергали воздействию AFM13; указанные клетки были устойчивы к наивным НК-клеткам и практически устойчивы к IL-2 или IL-15-культивируемым НК-клеткам (фиг. 5, В). Что более важно, даже лизис клеток линий CD30⁻ лимфомы L1236 и Daudi был усилен первоначальным воздействием тандемного диатела AFM13 (фиг. 5, В). Это усиление было особенно выражено для клеток-мишеней, слабо восприимчивых к культивируемым с IL-2 НК-клеткам, в то время как сильный лизис чувствительных клеток-мишеней K562 культивируемыми с IL-2 НК-клетками не улучшался в дальнейшем. Усиление цитотоксической функции наблюдали также для тандемного диатела AFM12 или предварительно активированных ритуксимабом НК-клеток.

Таким образом, AFM13 -опытные НК-клетки, активированные цитокинами, проявляли усиленную цитотоксичность в ответ на CD30⁺ и даже CD30⁻ клетки лимфомы по сравнению с НК-клетками, активированными только цитокинами.

Пример 6.

Восстановление опосредованной CD16A функции НК-клеток после воздействия тандемного диатела к EGFR/CD16A (AFM24) и тандемного диатела к BCMA/CD16A (AFM26).

Как и для AFM13, что продемонстрировано в примере 2, тандемное диатело к EGFR/CD16A и тандемное диатело к BCMA/CD16A индуцируют функциональную активацию НК-клеток в ответ на клетки-мишени EGFR⁺ и BCMA⁺, соответственно (фиг. 7).

Подобно тому, как показано для AFM13 в примере 4, восстановление экспрессии CD16 и функции НК-клеток, опосредованной CD16A, достигается обработкой IL-2 или IL-15 в течение 5 дней после воздействия тандемного диатела к EGFR/CD16A и тандемного диатела к BCMA/CD16A, соответственно, как описано в примере 4 (фиг. 8 и 9).

Следовательно, режим периодического дозирования, раскрытый в рамках настоящей заявки, может быть использован для мультиспецифичных, а именно биспецифичных, антигенсвязывающих белков, связывающих CD16A, независимо от домена антигена-мишени.

Краткое описание последовательностей:

SEQ NO.	Последовательность
1	HCDR1 CD16A GYTFTSYY
2	HCDR2 CD16A IEPMYGST
3	HCDR3 CD16A ARGSAYYDFADY
4	LCDR1 CD16A NIGSKN
5	LCDR2 CD16A QDN
6	LCDR3 CD16A QVWDNYSVL
7	HCDR2 CD16A INPSGGST
8	VH CD16A QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGLV TVSS
9	VL CD16A SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQORPGQSPVLVIYQDNKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL
10	VH CD16A QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGLV TVSS

СЫЛКИ:

- Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di, F. F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frebourg, T., Michel, P., Sabourin, J. C., Boissiere-Michot, F. 2009. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 27, 1122-1129.
- Bonnema, J. D., Karnitz, L. M., Schoon, R. A., Abraham, R. T., Leibson, P. J. 1994. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 180, 1427-1435.
- Borrego, F., Lopez-Beltran, A., Pena, J., Solana, R. 1994. Downregulation of Fc gamma receptor IIIA alpha (CD16-II) on natural killer cells induced by anti-CD16 mAb is independent of protein tyrosine kinases and protein kinase C. *Cell Immunol* 158, 208-217.
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S. D. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206, 1495-1503.
- Bryceson, Y. T., Ljunggren, H. G., Long, E. O. 2009. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* 114, 2657-2666.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., Long, E. O. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.
- Capuano, C., Romanelli, M., Pighi, C., Cimino, G., Rago, A., Molfetta, R., Paolini, R., Santoni, A., Galandrini, R. 2015. Anti-CD20 Therapy Acts via Fc{gamma}RIIIA to Diminish Responsiveness of Human Natural Killer Cells. *Cancer Res* 75, 4097-4108.
- Cassatella, M. A., Anegon, I., Cuturi, M. C., Griskey, P., Trinchieri, G., Perussia, B. 1989. Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc gamma R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 169, 549-567.
- Cerwenka, A., Lanier, L. L. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41-49.

- Cerwenka, A., Lanier, L. L. 2016. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* 16, 112-123.
- Charych D., Khalili, S., Dixit, V., Kirk, P., Chang, T., Langowski, J., Rubas, W., Doberstein, K., Eldon, M., Hoch, U., Zalevsky, J., 2017, Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR-214, a kinetically-controlled interleukin-2 (IL2) receptor agonist for cancer immunotherapy, *PLoS ONE* 12(7):e0179431.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., Geha, R. 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143, 1283-1289.
- Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., Yang, L., Carrero, J. A., Yokoyama, W. M. 2009. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1915-1919.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G. 2004. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64, 4664-4669.
- de Landazuri, M. O., Silva, A., Alvarez, J., Herberman, R. B. 1979. Evidence that natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity are mediated in humans by the same effector cell populations. *J Immunol* 123, 252-258.
- Galandrini, R., Tassi, I., Mattia, G., Lenti, L., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. 2002. SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells. *Blood* 100, 4581-4589.
- Gasser, S., Raulet, D. H. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 214, 130-142.
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M. A., Le Floch, A., Huse, M., Sun, J. C., Rudensky, A. Y. 2013. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med* 210, 1167-1178.
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Xue, L., Morris, S. W., Penninger, J. M., Yoshida, H., Saito, T. 2008. Cell type-specific regulation of ITAM-mediated NF-kappaB activation by the adaptors, CARMA1 and CARD9. *J Immunol* 181, 918-930.
- Harris, M. 2004. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 5, 292-302.
- Kim, M., Kim, T. J., Kim, H. M., Doh, J., Lee, K. M. 2017. Multi-cellular natural killer (NK) cell clusters enhance NK cell activation through localizing IL-2 within the cluster. *Sci Rep* 7, 40623.
- Kipriyanov SM: *Methods Mol Biol* 2003;207:323-33

- Kipriyanov SM: *Methods Mol. Biol.* 2009; 562:177-93
- Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., Mandelboim, O., 2013, Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection, *Trends. Immunol.*, 34(4):192-91
- Koehl, U., Kalberer, C., Spanholtz, J., Lee, D. A., Miller, J. S., Cooley, S., Lowdell, M., Uharek, L., Klingemann, H., Curti, A., Leung, W. and Alici, E., 2016, Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control, *Oncoimmunology*, 5(4) e1115178.
- Kondadasula, S. V., Roda, J. M., Parihar, R., Yu, J., Lehman, A., Caligiuri, M. A., Tridandapani, S., Burry, R. W., Carson, W. E., 3rd. 2008. Colocalization of the IL-12 receptor and FcγRIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon-gamma. *Blood* 111, 4173-4183.
- Kontermann, R. E. Brinkmann, U. The making of bispecific antibodies, 2017 *mAbs*, 9(2):182-212).
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR. et al.2003, *Categories of Tumor Antigens, Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.*, editors Hamilton (ON):Becker
- Kuylenskierna, C., Bjorkstrom, N. K., Andersson, S. K., Sahlstrom, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K. J., Ljunggren, H. G., Moll, M., Sandberg, J. K. 2011. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* 41, 1913-1923.
- Lajoie, L., Congy-Jolivet, N., Bolzec, A., Gouilleux-Gruart, V., Sicard, E., Sung, H. C., Peiretti, F., Moreau, T., Vie, H., Clemenceau, B., Thibault, G. 2014. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIa on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J Immunol* 192, 741-751.
- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J., Phillips, J. H. 1988. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* 141, 3478-3485.
- Li, W., Yang, H., Dimitrov, D. S. 2016. Identification of high-affinity anti-CD16A allotype-independent human antibody domains. *Exp Mol Pathol* 101, 281-289.
- Liu, B., Kong, L., Han K., Hong, H, Marcus, W. D., Chen, X., Leng, E. K., Alter, S., Zhu, X., Rubinsein M. R., Shi, S., Rhode, P. r., Cai, W. Wong, H. C. ; 2016 A novel fusion of ALT-803 (interleukin (IL)-15 superagonist) with an antibody demonstrates antigen-specific antitumor responses, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291 (46), pp. 23869-23881
- Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Olivini G, Brivio F, Tisi E, Tancini G, Characiejus D, Kothari L. 1993 Cancer immunotherapy with low-dose interleukin-2 subcutaneous administration: potential

efficacy in most solid tumor histotypes by a concomitant treatment with the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1993 Oct-Dec;7(4):121-5

Luetke-Eversloh, M., Hammer, Q., Durek, P., Nordstrom, K., Gasparoni, G., Pink, M., Hamann, A., Walter, J., Chang, H. D., Dong, J., Romagnani, C. 2014. Human cytomegalovirus drives epigenetic imprinting of the IFNG locus in NKG2Chi natural killer cells. *PLoS Pathog* 10, e1004441.

Marquez, M. E., Millet, C., Stekman, H., Conesa, A., Deglesne, P. A., Toro, F., Sanctis, J. D., Blanca, I. 2010. CD16 cross-linking induces increased expression of CD56 and production of IL-12 in peripheral NK cells. *Cell Immunol* 264, 86-92.

Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M. C., Moretta, A. 2006. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 18, 151-158.

Mota, G., Moldovan, I., Calugaru, A., Hirt, M., Kozma, E., Galatiuc, C., Brasoveanu, L., Boltz-Nitulescu, G. 2004. Interaction of human immunoglobulin G with CD16 on natural killer cells: ligand clearance, FcγRIIIA turnover and effects of metalloproteinases on FcγRIIIA-mediated binding, signal transduction and killing. *Scand J Immunol* 59, 278-284.

Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M., Ardizzoni, A. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1789-1796.

Nakahira, M., Ahn, H. J., Park, W. R., Gao, P., Tomura, M., Park, C. S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H. 2002. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-γ gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-γ promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J Immunol* 168, 1146-1153.

Ni, J., Holsken, O., Miller, M., Hammer, Q., Luetke-Eversloh, M., Romagnani, C., Cerwenka, A. 2016. Adoptively transferred natural killer cells maintain long-term antitumor activity by epigenetic imprinting and CD4+ T cell help. *Oncoimmunology* 5, e1219009.

Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., Cerwenka, A. 2012. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J. Exp. Med.* 209, 2351-2365.

Pahl, J., Cerwenka, A. 2017. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology* 222, 11-20.

Pahl, J. H., Ruslan, S. E., Buddingh, E. P., Santos, S. J., Szuhai, K., Serra, M., Gelderblom, H., Hogendoorn, P. C., Egeler, R. M., Schilham, M. W., Lankester, A. C. 2012. Anti-EGFR antibody

cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells toward osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 18, 432-441.

Parkhurst, M. R., Riley, J. P., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A. 2011. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 17, 6287-6297.

Reiners, K. S., Kessler, J., Sauer, M., Rothe, A., Hansen, H. P., Reusch, U., Hucke, C., Kohl, U., Durkop, H., Engert, A., von Strandmann, E. P. 2013. Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther* 21, 895-903.

Reusch, U., Burkhardt, C., Fucek, I., Le Gall, F., Le Gall, M., Hoffmann, K., Knackmuss, S. H., Kiprijanov, S., Little, M., Zhukovsky, E. A. 2014. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells. *MAbs* 6, 728-739.

Rolle, A., Brodin, P. 2016. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends Immunol* 37, 233-243.

Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B., Miller, J. 2013. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121, 3599-3608.

Romee, R., Schneider, S. E., Leong, J. W., Chase, J. M., Keppel, C. R., Sullivan, R. P., Cooper, M. A., Fehniger, T. A. 2012. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120, 4751-4760.

Romee, R, Leong J. W, Fehniger, T. A, 2014, Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer, Hindawi Publishing Corporation Scientificy Article ID 205796

Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA1, Schappe T, Leong JW, Abdel-Latif S, Schneider SE, Willey S, Neal CC, Yu L, Oh ST, Lee YS, Mulder A, Claas F, Cooper MA, Fehniger TA, 2016, Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia *Sci Transl Med.* Sep 21;8(357):357ra123.

Rothe, A., Sasse, S., Topp, M. S., Eichenauer, D. A., Hummel, H., Reiners, K. S., Dietlein, M., Kuhnert, G., Kessler, J., Buerkle, C., Ravic, M., Knackmuss, S., Marschner, J. P., Pogge von Strandmann, E., Borchmann, P., Engert, A. 2015. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 125, 4024-4031.

Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K. J., Ljunggren, H. G., Miller, J. S., Bryceson, Y. T. 2015. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 42, 443-456.

Schuster, I. S., Coudert, J. D., Andoniou, C. E., Degli-Esposti, M. A. 2016. "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol* 7, 235.

Spiess, C. et al., Alternative molecular formats for bispecific antibodies. 2015, *Mol. Immunol.*, 67(2):95-106

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N., Mebius, R. E., Powrie, F., Vivier, E. 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145-149.

Sun, J. C., Ugolini, S., Vivier, E. 2014. Immunological memory within the innate immune system. *EMBO J* 33, 1295-1303.

Tesi, B., Schlums, H., Cichocki, F., Bryceson, Y. T. 2016. Epigenetic Regulation of Adaptive NK Cell Diversification. *Trends Immunol* 37, 451-461.

Vivier, E., Morin, P., O'Brien, C., Druker, B., Schlossman, S. F., Anderson, P. 1991. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* 146, 206-210.

Weichel et al., TandAbs: potent and well-manufacturable bi-specific antibodies; *European Pharmaceutical Review* 2015, vol. 20:27-32

Weinberg, R. A., *The Biology of Cancer*, 2013, 2nd Edition, Taylor and Francis

Wherry, E. J., Kurachi, M. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486-499.

Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M. R., Warlick, E., Gleason, M. K., Ross, J. A., Luo, X., Weisdorf, D. J., Walcheck, B., Vallera, D. A., Miller, J. S. 2013. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res* 19, 3844-3855.

Zompi, S., Colucci, F. 2005. Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells. *Immunol Lett* 97, 31-39.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ иммунотерапии на основе НК-клеток, включающий введение субъекту эффективной дозы антигенсвязывающего белка, содержащего по меньшей мере один антигенсвязывающий участок для CD16A и по меньшей мере один дополнительный антигенсвязывающий участок для антигена-мишени, отличного от CD16A, и введение эффективной дозы по меньшей мере одного цитокина, активирующего НК клетки, при этом указанный антигенсвязывающий белок вводят периодически в цикле дозирования, включающем следующие стадии:

- (a) введение первой дозы указанного антигенсвязывающего белка; и
- (b) введение второй дозы указанного антигенсвязывающего белка после по меньшей мере трехкратного периода полувыведения указанного антигенсвязывающего белка после стадии (a), и
- (c) введение дозы по меньшей мере одного цитокина в течение интервала между стадией (a) и стадией (b) после окончания периода полувыведения указанного антигенсвязывающего белка.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный цикл дозирования, включающий интервал между стадиями (a) и (b), повторяют по меньшей мере два раза.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный цитокин вводят после по меньшей мере одного периода полувыведения указанного антигенсвязывающего белка после стадии (a).

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок имеет период полувыведения менее 1 недели, предпочтительно менее чем 24 ч.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для CD16A.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный антиген-мишень выбран из группы, состоящей из опухолевого антигена, бактериального вещества или вирусного антигена.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный цитокин, активирующий НК-клетки, выбран из группы, состоящей из интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 12 (IL-12), интерлейкина 15 (IL-15) и интерлейкина 18 (IL-18), интерлейкина 21 (IL-21) или их комбинации.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что вводят интерлейкин 2 (IL-2) или интерлейкин 15 (IL-15).

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка для антигена-мишени.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифичное и четырехвалентное тандемное диатело.

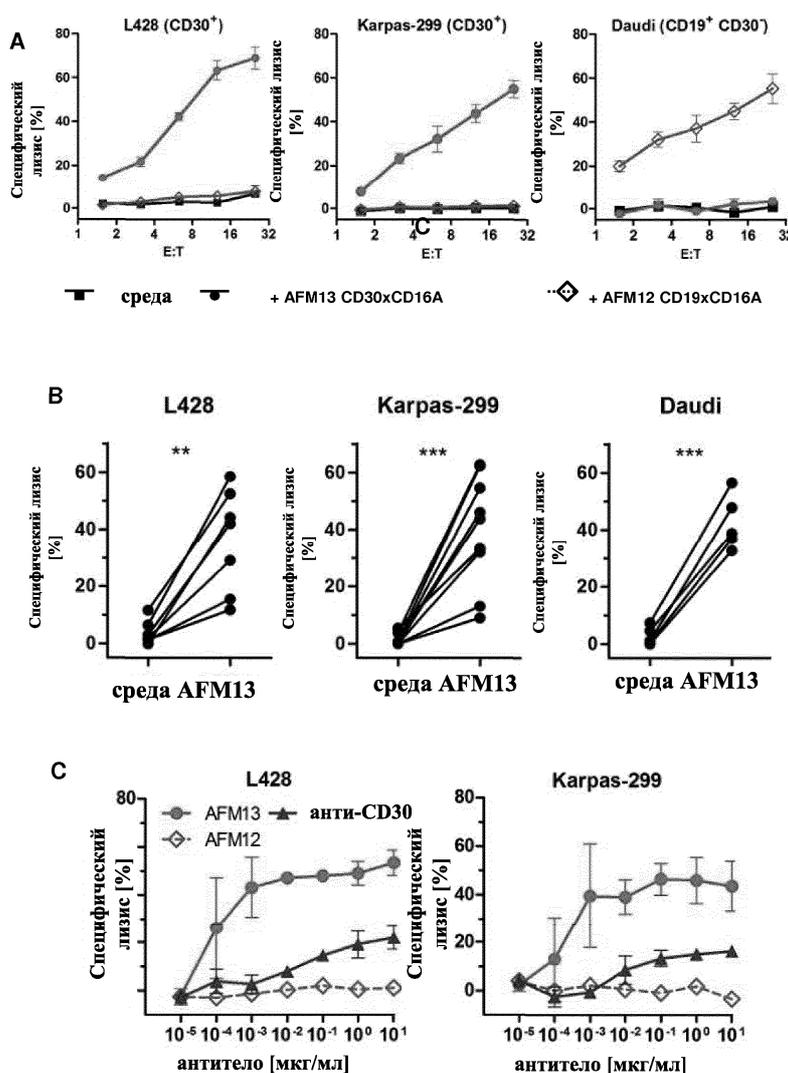
11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанный опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD30, EGFR, EGFRvIII и BCMA.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок представляет собой тандемное диатело.

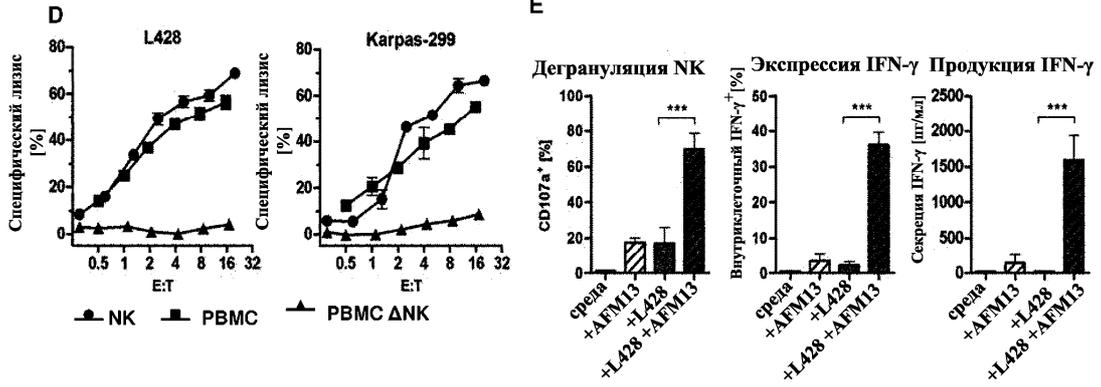
13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что иммунотерапия на основе НК-клеток включает стадию стимуляции НК-клеток, выбранную из группы, состоящей из стимуляции цитокином *in vivo* и стимуляции цитокином *ex vivo*.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что иммунотерапия на основе НК-клеток включает стадию стимуляции НК-клеток *ex vivo*, на которой либо аутологичные, либо аллогенные НК-клетки приводят в контакт с цитокином и размножают *ex vivo*, и после чего вводят путем инфузии субъекту, подлежащему лечению.

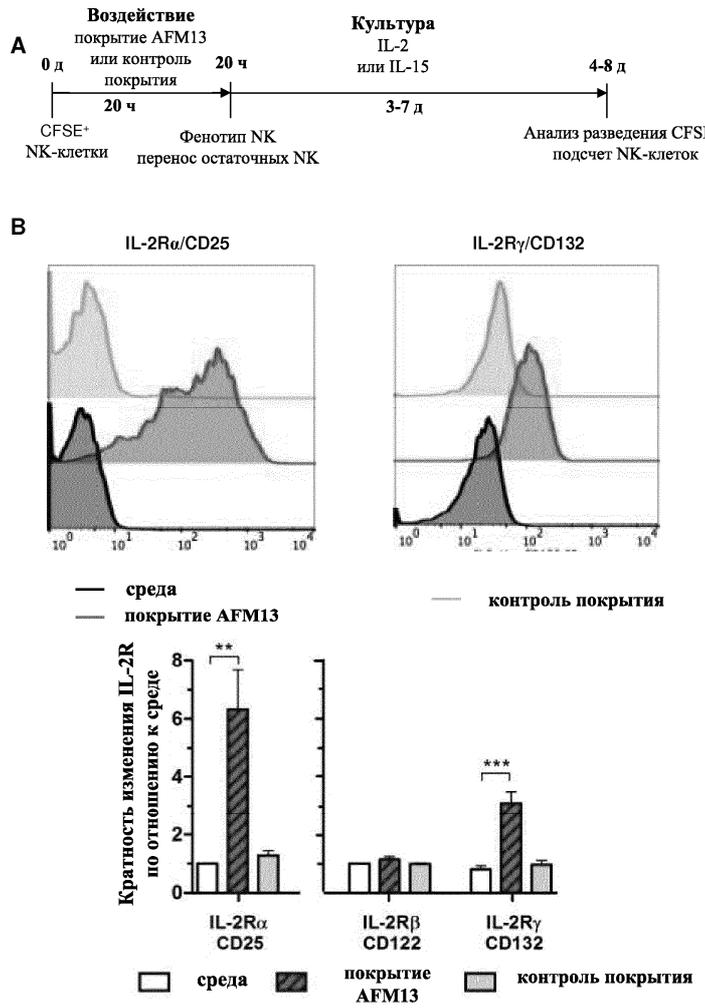
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок вводят *ex vivo* НК-клеткам, и после этого вводят путем инфузии вместе с НК-клетками субъекту, подлежащему лечению.



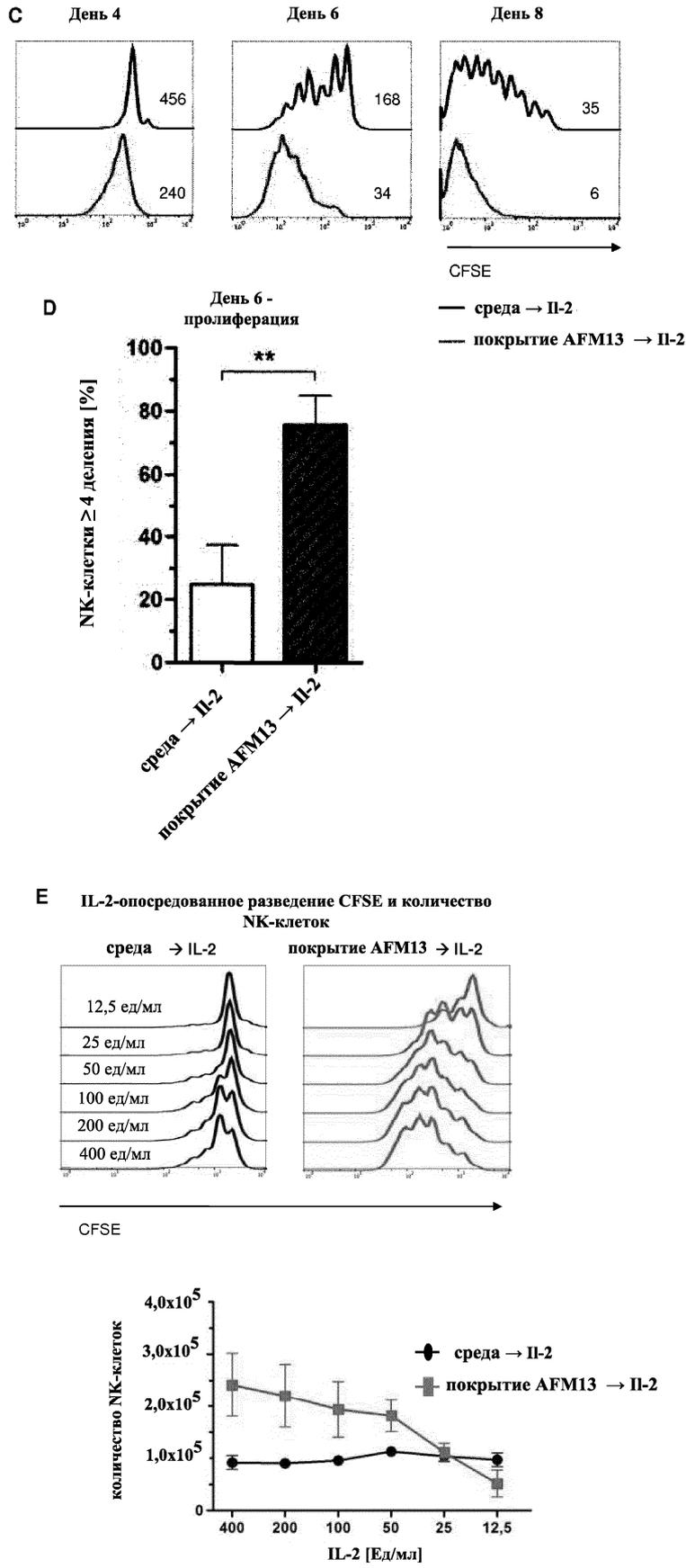
Фиг. 1



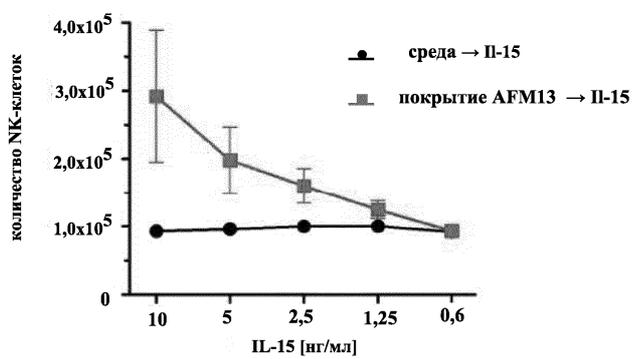
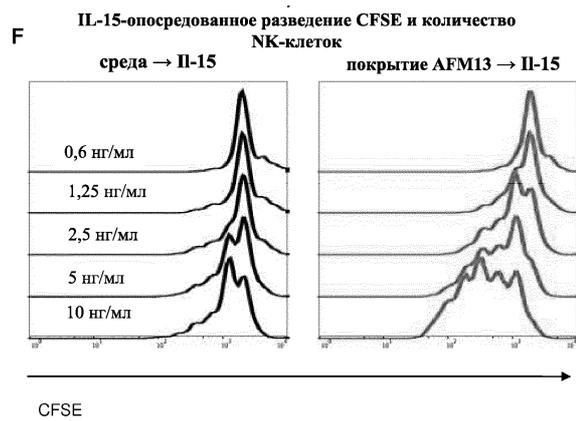
Фиг. 1 (продолжение)



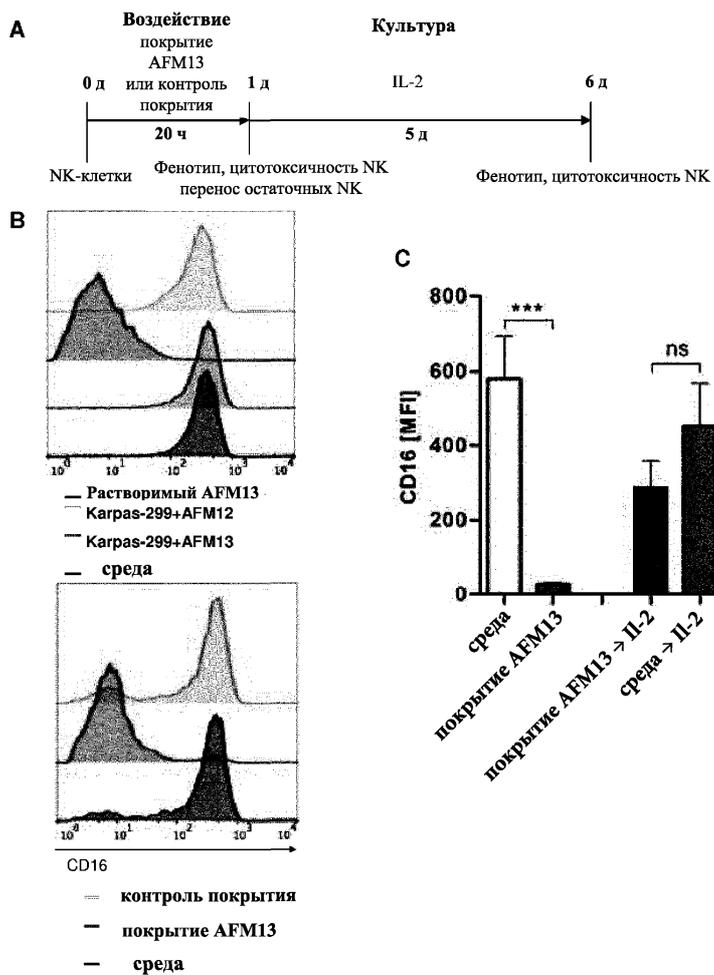
Фиг. 2



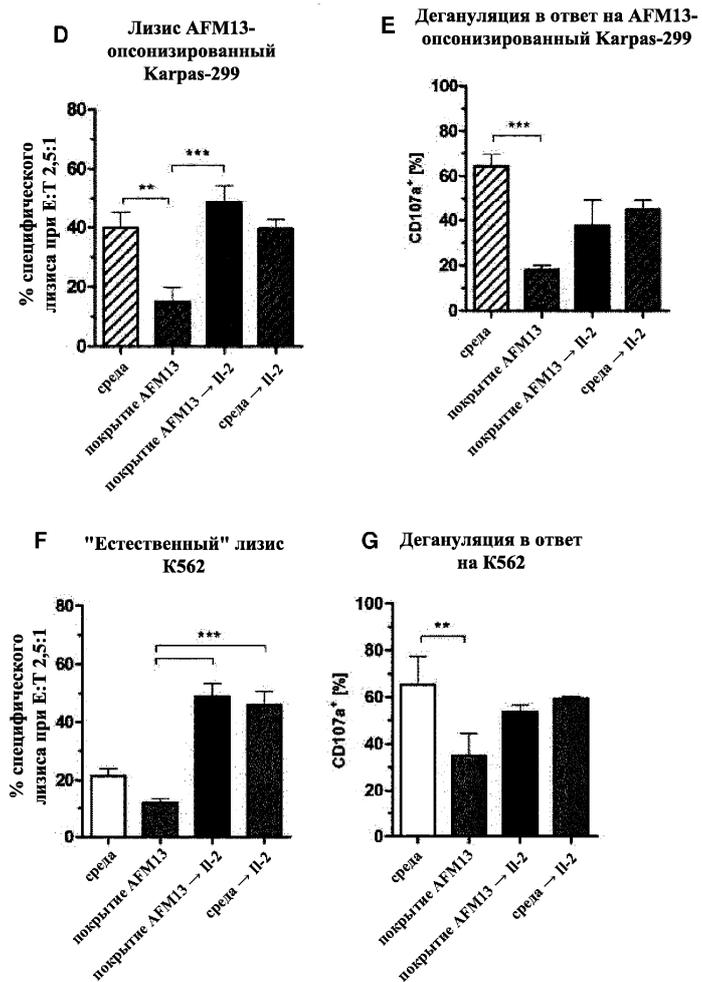
Фиг. 2 (продолжение)



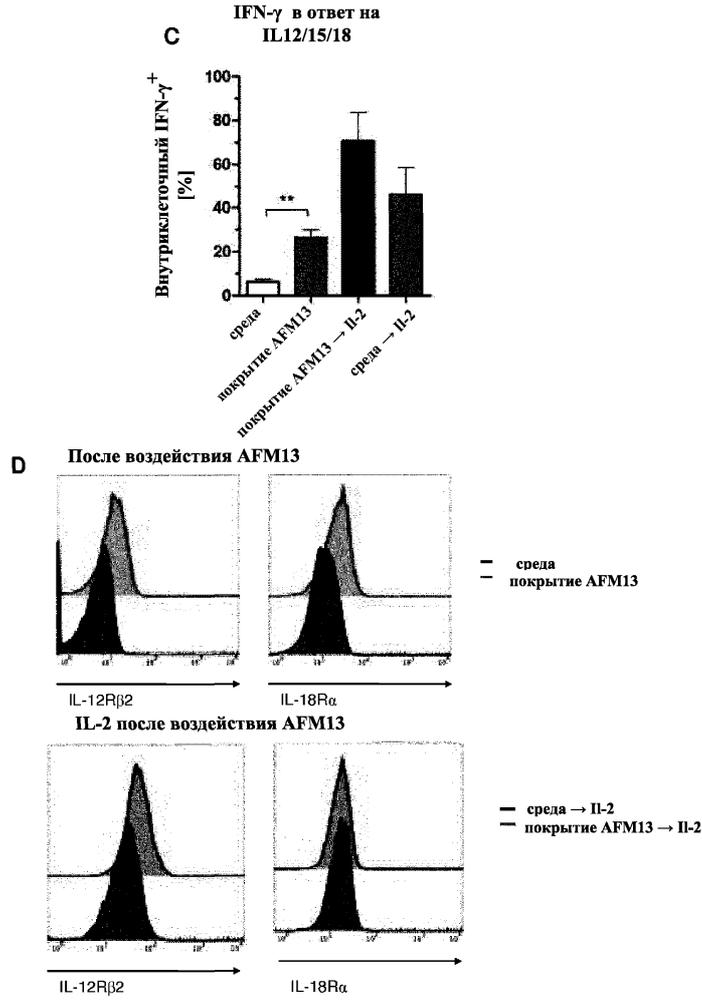
Фиг. 2 (продолжение)



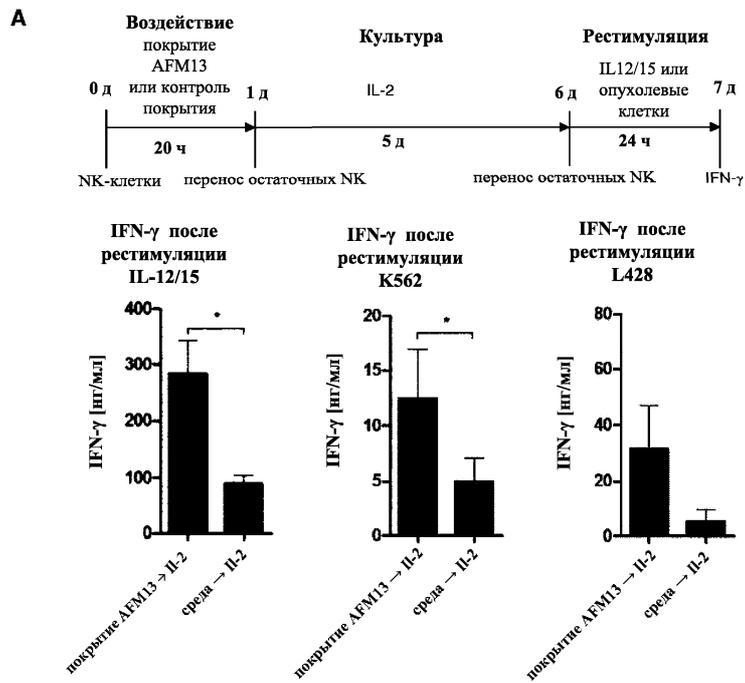
Фиг. 3



Фиг. 3 (продолжение)

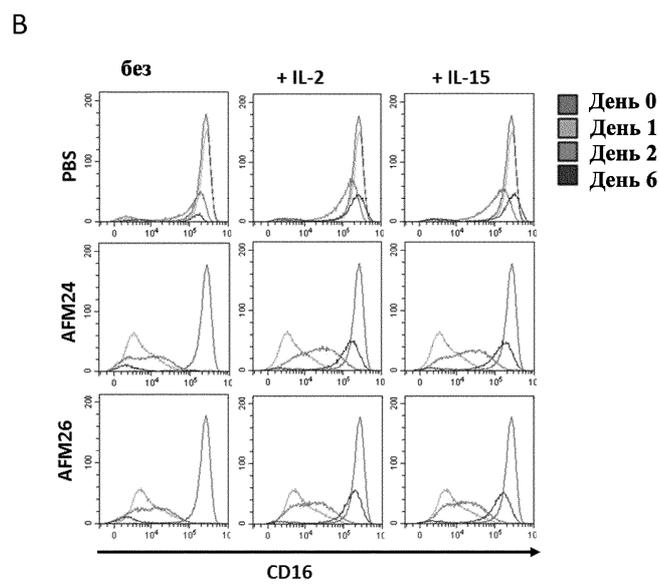
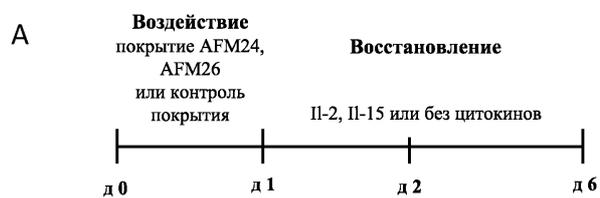
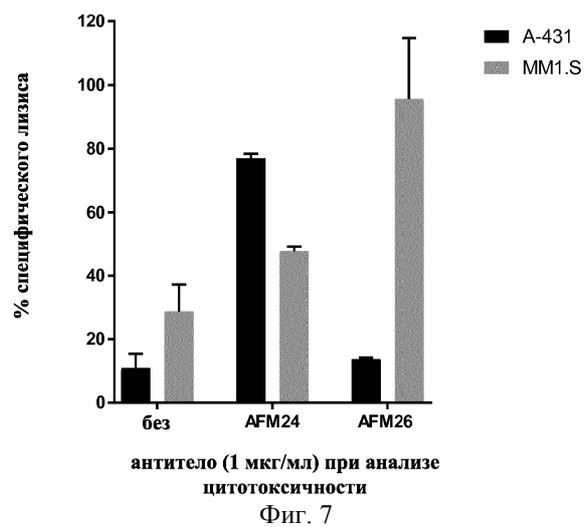


Фиг. 4 (продолжение)

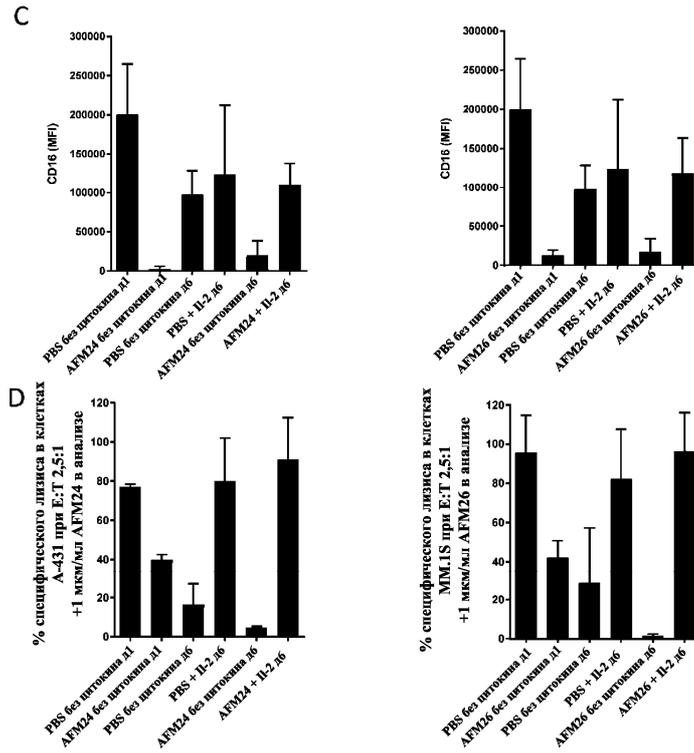


Фиг. 5

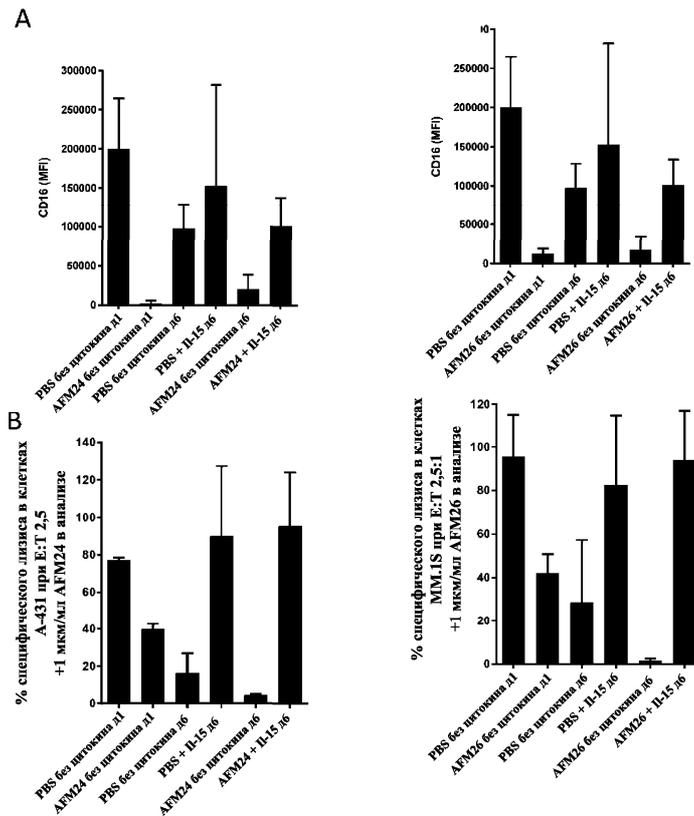
045300



Фиг. 8



Фиг. 8 (продолжение)



Фиг. 9

