

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390448** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.22

(22) Дата подачи заявки
2021.08.02

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРОДУКТ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **FR2008211**

(32) **2020.07.31**

(33) **FR**

(86) **PCT/EP2021/071586**

(87) **WO 2022/023581 2022.02.03**

(71) Заявитель:
**ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ МОНПЕЛЬЕ;
ЭНСТИТУ НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ САНТЕ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (ЭНСЭРМ); САНТР
ОСПИТАЛЬЕ ЮНИВЕРСИТЕР
ДЕ МОНПЕЛЬЕ (СХЮМ); ИКМ
(ЭНСТИТУ ДЕ КАНСЕРОЛОЖИ ДЕ
МОНПЕЛЬЕ) (FR)**

(72) Изобретатель:

**Виллальба Мартин, Йоргенсен
Кристиан, Робер Брюно, Мартино
Пьер, Эрнандес Франсиско Хавьер,
Презюме Жесси (FR)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к области терапевтического лечения, в частности, клеточной терапии на основе CD16+ клеток и клеток NK (естественных киллеров). В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CD16+ клетку, NK-клетку или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом, содержащим модифицированную область Fc, в частности, модифицированный домен CH2. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей CD16+ клетку и/или NK-клетку, в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным к связыванию с поверхностным белком FcγRIII (CD16), где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с поверхностным белком FcγRIII (CD16), экспрессированным CD16+ клеткой, и где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированный домен CH2 IgG1 человека дикого типа, связанный, необязательно, посредством линкера, с (ii) лигандсвязывающим доменом, где лигандсвязывающий домен содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью; где модифицированный домен CH2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена CH2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен CH2 IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO: 1 и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU.

A1

202390448

202390448

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577152EA/032

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРОДУКТ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области терапевтического лечения, в частности, клеточной терапии на основе CD16+ клеток и/или клеток NK (естественных киллеров) и/или предшественников NK-клеток. Более конкретно, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CD16+ клетку, NK-клетку или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом, содержащим модифицированную область Fc, в частности, модифицированный домен C_H2.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Разработка видов клеточной терапии является процессом, полностью распространяющимся на лечение прогрессирующих заболеваний, таких как злокачественные опухоли, серьезные инфекции или отторжение трансплантата после трансплантации органа или стволовой клетки. Большинство научных и клинических прорывов получено в первую очередь против злокачественных опухолей. Клеточная терапия возникла в качестве очень многообещающего варианта терапии против злокачественных опухолей в результате клинических успехов, полученных с использованием Т-клеток, генетически модифицированных посредством химерного рецептора, обозначенного как CAR (химерный рецептор антигена) (CAR-T-клеток), в частности, в лечении В-клеточных лимфопролиферативных нарушений.

В настоящее время, CAR-T-клетки, одобренные FDA (Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств), основаны на аутологичных Т-клетках (полученных от пациента), генетически модифицированных в сертифицированных консультативных центрах до выпуска и повторной инфузии пациенту. Тем не менее, у значительного количества пациентов, лечение посредством CAR-T-клеток является ассоциированным с последующими побочными эффектами, даже летальными эффектами (Santomasso B, Bachier C, Westin J, Rezvani K, Shpall EJ. The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2019; 39: 433-444. doi: 10.1200/EDBK_238691). Кроме того, логистика и стоимость этого типа лечения противоречит его крупномасштабному использованию. Таким образом, поскольку большее количество пациентов может получать преимущество от этих типов клеточной терапии, является необходимым разрабатывать альтернативы, которые преодолевают недостатки CAR-T-клеток и обеспечивают возможность новых вариантов лечения.

Одной из исследуемых альтернатив является использование клеток NK (естественных киллеров): цитотоксических лимфоцитов, которые могут разрушать клетки-мишени без предшествующей антигенной стимуляции. Тем не менее, ряд фундаментальных доклинических и клинических исходов показывают, что только NK-

клетки не являются эффективными для лечения различных гематологических и негематологических злокачественных патологий. Конкретно, эти НК-клетки являются недостаточно эффективными для узнавания своей мишени и/или недостаточно цитотоксическими для оказания желательного терапевтического эффекта. С целью увеличения их эффективности, эти НК-клетки можно «вооружать» для узнавания специфических для клеток-мишеней антигенов (Sanchez-Martinez et al., *Theranostics* 8(14):3856-3869, June 2018).

Однако, все еще существует необходимость в наличии новых композиций в клеточной терапии, которые не индуцируют или индуцируют мало побочных эффектов, являются менее дорогими, высоко стабильными с течением времени и подходящими для большинства пациентов и для большинства патологий.

Существует также необходимость в предоставлении новых способов введения терапевтических соединений, таких как терапевтические антитела и другие терапевтические соединения, которые можно надежно направлять к соответствующей мишени и с уменьшенными побочными эффектами.

Целью настоящего изобретения является удовлетворение всех или части этих потребностей.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к CD16+ клеткам, НК-клеткам или предшественникам НК-клеток, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc, предпочтительно, по меньшей мере с одной модификацией в домене C_H2, и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная модифицированная область Fc является способной к связыванию с указанными клетками или их предшественниками.

Как указано в примерах далее в настоящем описании, авторы настоящего изобретения отметили, что CD16+ клетки, в частности, НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным связываться с лигандом или лигандами, остаются стабильными *in vitro* и *in vivo* в течение нескольких суток. Кроме того, отмечено, что эти вооруженные CD16+ клетки, в частности НК-клетки, являлись, таким образом, способными к специфическому нацеливанию на клетки-мишени посредством узнавания соответствующего лиганда(ов).

Маркер поверхности клетки CD16 также обозначен в настоящем описании как поверхностный рецептор FCγRIII.

В соответствии с одним из его объектов, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CD16+ клетку, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной CD16+ клеткой.

В соответствии с одним из его объектов, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку NK (естественный киллер) или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой или с предшественником NK-клетки.

Авторы настоящего изобретения неожиданно отметили, что NK-клетка, представляющая собой CD16+ клетку, отобранную у индивидуума и вооруженную *in vitro* с использованием рекомбинантного полипептида, как определено по настоящему изобретению, позволяет увеличение NK-клеточной цитотоксичности против клетки-мишени. Неожиданно, и в противоречии с объяснениями в Moore et al. 2010, связывание между рецептором Fc NK-клетки и рекомбинантным полипептидом, в соответствии с настоящим изобретением, остается стабильным и специфическим в течение нескольких суток, в частности, в течение по меньшей мере 7 суток, *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, доказано, что эта комбинация NK-клетки и рекомбинантного полипептида, как определено в настоящем описании, которая обозначена как «вооруженная NK-клетка», является эффективным терапевтическим решением против любого заболевания, лечение которого подразумевает разрушение представляющих интерес клеток-мишеней. Это терапевтическое решение не нуждается в генетической модификации NK-клетки, в отличие от NK-CAR-клеток, конкретно описанных в обзоре Wang et al. (Luyao Wang, Mei Dou, Qingxia Ma, Ruixue Yao, Jia Liu; Chimeric antigen receptor (CAR)-modified NK cells against cancer: Opportunities and challenges; International Immunopharmacology 74 (2019) 105695), что делает эту комбинацию намного более простой для применения, чем NK-CAR-клетки. Фактически, один образец NK-клеток, например, отобранных из пуповинной крови, является достаточным для лечения любого индивидуума для всех без исключения специфичностей нацеливания, для которых можно идентифицировать соответствующий лиганд.

Авторы настоящего изобретения, таким образом, предоставляют экспериментальное доказательство того, что CD16+ клетки, которые могут, в частности, соответствовать линиям клеток естественных киллеров, можно комбинировать, эффективно и стабильным образом, с рекомбинантным полипептидом, содержащим модифицированную область Fc.

Кроме того, по настоящему изобретению показано, что рекомбинантный полипептид, как описано в настоящем описании, имеет высокую аффинность для рецептора CD16, в частности, рецептора CD16a, в течение длительного периода времени.

Авторы настоящего изобретения предоставили также экспериментальное доказательство того, что прикрепление к указанным клеткам также является стабильным, и даже подходящим для терапии, когда рекомбинантный полипептид связан нековалентно. Соответственно, «связывание» или «прикрепление» указанного

рекомбинантного полипептида к CD16+ клетке и/или NK-клетке, или предшественнику NK, предпочтительно, рассматривают как «нековалентное».

Авторы настоящего изобретения также предполагают, что соответствующий способ является подходящим для введения терапевтических соединений с уменьшенными дозами и/или уменьшенными побочными эффектами.

Авторы настоящего изобретения также предполагают, что соответствующий способ является подходящим для связывания, в частности, нековалентного связывания, таких CD16+ клеток и/или NK-клеток, и/или их предшественников, с множеством рекомбинантных полипептидов с модифицированной областью Fc, в соответствующем настоящему изобретению смысле.

В соответствии с одним из этих объектов, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей CD16+ клетку в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным к связыванию с поверхностным белком FcγRIII (CD16), предпочтительно, с поверхностным белком FcγRIIIa/CD16a, где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с поверхностным белком FcγRIII (CD16), предпочтительно, с поверхностным белком FcγRIIIa/CD16a, экспрессированным CD16+ клеткой, и где указанный рекомбинантный полипептид содержит:

(i) модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, связанный, необязательно, посредством линкера, с

(ii) лигандсвязывающим доменом,

где лигандсвязывающий домен содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью;

где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO 1, или последовательностью с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен посредством SEQ ID NO. 1. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_H2 является модифицированным, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, представленного SEQ ID NO 1

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, поверхностный белок FcγRIII (CD16) представляет собой поверхностный белок FcγRIIIa/CD16a.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T, G236A и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T и A330L, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F и S324T, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и H268F, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и A330L, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E, H268F и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модификация домена C_{H2} , относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа, состоит из мутаций S239D и I332E.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD16+ клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид представляет собой антитело, и модификация в домене C_{H2} является симметричной или асимметричной, относительно пары доменов C_{H2} (или пары тяжелых цепей), составляющих антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид содержит область Fc (кристаллизующийся фрагмент) IgG1 человека, содержащую модифицированный домен C_{H2} .

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие модифицированный домен C_{H2} , как определено в настоящем описании, или область Fc, как определено в настоящем описании, и лигандсвязывающий домен, выбранный из лигандсвязывающего домена любого из следующих антител: абаговомаб, абатацепт, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумаб, адуканумаб, афлиберцепт, афутузумаб, алацизумаб, алефацепт, алемтузумаб, алирокумаб, альтумаб, аматуксимаб, анатумаб, анетумаб, анифромумаб, анрукинзумаб, аполизумаб,

арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, бапинейзумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белатацепт, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб, блинатумомаб, блосозумаб, бокоцизумаб, брентуксимаб, бриакимумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтицизумаб, канакинумаб, кантузумаб, каплацизумаб, капромаб, карлумаб, катумаксомаб, цеделизумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, цитатузумаб, циксутумумаб, клазаксизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб, кодритузумаб, колтуксимаб, конатумумаб, концизумаб, кренезумаб, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб, деносумаб, дерлотуксимаб, детумомаб, динутуксимаб, диридавумаб, дорлимомаб, дрозитумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, эслилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб, энлимомаб, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этанерцепт, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фазимумаб, фелвизумаб, фезкимумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форовирумаб, фрезолимумаб, фулрамумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб, голимумаб, гомиликсимаб, гуселкумаб, ибализумаб, ибритумомаб, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб, индусатумаб, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, ламбролизумаб, лампализумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб, лигелизумаб, лилотомаб, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, лулизумаб, лумиликсимаб, лумретузумаб, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб, митумомаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб, муромонаб-CD3, наколомаб, намилумаб, наптумомаб, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлертузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пазотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб, пинтумомаб, полатузумаб, понезумаб, приликсимаб, притумумаб, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб,

ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилонацепт, рилотумумаб, ринкукумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб, секукимумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стаmulумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб, тарекстумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тесидолумаб, TGN 1412, тицлимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокимумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекимумаб, вандортузумаб, ванктикумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлимумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, зив-афлиберцепт и золимомаб.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции, как определено в настоящем описании, могут быть предназначены для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления, композиции, как определено в настоящем описании, могут быть предназначены для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию, как определено в настоящем описании, необязательно, дополнительно содержащей наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD16+ клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, может быть предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления, фармацевтическая композиция, как определено в настоящем описании, может быть предназначена для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей клетку NK (естественный киллер) в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным к связыванию с поверхностным белком FcγRIII (CD16), где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с

поверхностным белком FcγRIII (CD16), экспрессированным клеткой NK (естественным киллером), и где указанный рекомбинантный полипептид содержит:

(i) модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, связанный, необязательно, посредством линкера, с

(ii) лигандсвязывающим доменом,

где лигандсвязывающий домен содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью;

где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен посредством SEQ ID NO. 1, или посредством последовательности с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD16 клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид представляет собой антитело, и модификация в домене C_H2 является симметричной или асимметричной, относительно пары доменов C_H2 (или пары тяжелых цепей), составляющих антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид содержит область Fc (кристаллизующийся фрагмент) IgG1 человека, содержащую модифицированный домен C_H2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие C_H2 домен, как определено в настоящем описании, и лигандсвязывающий домен, выбранный из лигандсвязывающего домена любого из антител, как определено в настоящем описании.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку NK (естественный киллер), в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO 1, или последовательностью с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к NK-клетке, аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума,

прикрепленной к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) связывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, как определено в настоящем описании; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к набору, содержащему:

- первую часть, содержащую CD16+ клетку, предпочтительно, CD16+ клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и
- вторую часть, содержащую рекомбинантный полипептид, как определено в настоящем описании; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к набору, содержащему:

- первую часть, содержащую NK-клетку, предпочтительно, NK-клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и
- вторую часть, содержащую рекомбинантный полипептид, как определено в настоящем описании; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к набору, содержащему:

- первую часть, включающую NK-клетку, предпочтительно, NK-клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и
- вторую часть, включающую рекомбинантный полипептид, содержащий (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), и (ii) лигандсвязывающий домен; где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, как определено в настоящем описании; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей CD16+ клетку, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) в аминокислотной последовательности области Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной CD16+ клеткой, и дополнительно содержащей наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку NK (естественный киллер) или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) в аминокислотной последовательности области Fc и (ii)

лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником, и дополнительно содержащей наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к НК-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественнику НК-клетки, прикрепленной к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc, способную к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником, и (ii) лигандсвязывающий домен; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение относится к набору, содержащему:

- первую часть, включающую НК-клетку, предпочтительно, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки;

- вторую часть, включающую рекомбинантный полипептид, содержащий (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен; где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или с предшественником НК-клетки; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, НК-клетки, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественника НК-клетки, или набора по настоящему изобретению, в способе лечения или предотвращения заболевания, где обеспечивает преимущество помещение указанной аллогенной или аутологичной НК-клетки или предшественника НК-клетки вблизи клетки-мишени для разрушения указанной клетки-мишени.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, НК-клетки, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественника НК-клетки, или набора по настоящему изобретению, в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания и его производных или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

В соответствии с другим из этих объектов, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* или *ex vivo* получения фармацевтической композиции, содержащей НК-клетку или предшественник НК-клетки, включающему следующие стадии: а) получения НК-клетки, предпочтительно, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественника НК-клетки; б) приведения указанной НК-

клетки или указанного предшественника NK-клетки в контакт с рекомбинантным полипептидом, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой или с предшественником NK-клетки.

В соответствии с одним вариантом осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая NK-клетку или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой или ее предшественником, может дополнительно содержать наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

В соответствии с одним вариантом осуществления, модифицированная область Fc может содержать аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO. 2-13.

В соответствии с одним вариантом осуществления, модифицированная область Fc может содержать аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 70% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, в частности, идентичность последовательности по меньшей мере 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, в частности, идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, и предпочтительно, модифицированная область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO. 2.

В соответствии с одним вариантом осуществления, модифицированная область Fc рекомбинантного полипептида может содержать по меньшей мере один модифицированный домен C_H2.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, модифицированный домен C_H2 области Fc рекомбинантного полипептида может содержать аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO. 2-13 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 70% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, в частности, идентичность последовательности по меньшей мере 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, в частности, идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 2, и предпочтительно, модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO. 2.

В соответствии с одним вариантом осуществления, CD16+ клетка и/или NK-клетка может являться аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет специфичность связывания полипептидов и антител Fc SDH, Fc LALA и Fc WT в комбинации с CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ eNK-клетками (NK-клетками из пуповинной крови *in vitro*),

Фигура 2 представляет стабильность связывания между полипептидами Fc SDH, Fc LALA и Fc WT и рецептором Fc (CD16A) CD16⁺/CD56⁺/CD45⁺/CD3⁻ eNK-клеток,

Фигура 3 представляет условия насыщения рецептора Fc на CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ eNK-клетках полипептидами Fc SDH и Fc WT,

Фигура 4 представляет цитотоксичность и уровень дегрануляции eNK-клеток, вооруженных антителами Fc SDH или Fc WT, применительно к выживаемости клеток рака молочной железы (линии клеток BT20),

Фигура 5 представляет присутствие антител (трастузумаба) Fc SDH и Fc WT на поверхности мембраны вооруженных eNK-клеток,

Фигура 6 представляет экспрессию рецептора CD16 на поверхности eNK-клеток, вооруженных (i) без Fc, (ii) антителом Fc LALA A647, (iii) антителом Fc WT A647 или (iv) антителом Fc SDH A647,

Фигура 7A представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образце перитонеальной жидкости, отобранном у взрослой мыши Swiss-nude,

Фигура 7B представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образце перитонеальной жидкости, отобранном у взрослой мыши Swiss-nude,

[Фигура 7C] представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образцах крови, костного мозга и селезенки взрослой мыши Swiss-nude,

Фигура 7D представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образцах крови, костного мозга и селезенки взрослой мыши Swiss-nude,

Фигура 8 представляет два варианта осуществления, иллюстрирующие рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению,

Фигура 9A представляет аффинность связывания *in vitro* рекомбинантных полипептидов Fc, по сравнению с Fc WT (дикого типа), с рецепторами CD16a и CD16b,

Фигура 9B представляет кинетику связывания на CD16⁺ клетках различных рекомбинантных полипептидов Fc от 1 час до 72 час после вооружения,

Фигура 10 представляет одновременное вооружение с использованием 2 рекомбинантных антител Fc SDH, содержащихся на CD16⁺ клетках,

Фигура 11 представляет эффективность *ex vivo* вооруженных CD16⁺ клеток с рекомбинантным ритуксимабом Fc SDH на положительных по CD20 клетках злокачественных опухолей.

На фигуре 1, которая представляет специфичность связывания полипептидов и антител Fc SDH, Fc LALA и Fc WT в комбинации с CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ eNK-клетками (NK-клетками из пуповинной крови *in vitro*): верхний график 1A представляет собой гистограмму, представляющую результаты для маркера Fc A647 на eNK-клетках. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), (ii) к Fc LALA A647, (iii) к Fc WT A647, (iv) к Fc SDH A647. X-ось: средняя интенсивность

флуоресценции (MFI) A647. Нижний график 1A. Y-ось: Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) модифицированного Fc A647, нормализованная по Fc WT A647. X-ось: (слева направо) eNK-клетки, вооруженные полипептидами (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647 и (iii) Fc SDH A647. Репрезентативные результаты из 3 независимых экспериментов с использованием eNK-клеток от 4 доноров. $*=p < 0,05$. Однофакторный ANOVA. Верхний график 1B представляет собой гистограмму, представляющую результаты для маркера антитела против Fc IgG FITC. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных (сверху вниз) (i) без антитела (только клетки), (ii) к антителу трастузумабу Fc WT и (iii) к антителу трастузумабу Fc SDH. X-ось: средняя интенсивность флуоресценции FITC. Нижний график 1B. Y-ось: Средняя интенсивность флуоресценции FITC. X-ось: eNK-клетки, прикрепленные (i) к антителу трастузумабу Fc WT и (ii) к антителу трастузумабу Fc SDH. Репрезентативные результаты 2 независимых экспериментов с использованием eNK от 3 доноров. Средний график 1C. Y-ось: средняя интенсивность флуоресценции A647 на eNK-клетках. X-ось: eNK-клетки, прикрепленные к полипептидам (слева направо) (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647 или (iii) Fc SDH A647. Правый график 1C. Y-ось: Процент Fc⁺ eNK-клеток в образце CD16⁻ eNK-клеток и в образце CD16⁺ клеток. X-ось: eNK-клетки, прикрепленные к полипептидам (слева направо) (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647 или (iii) Fc SDH A647. Репрезентативные результаты 3 независимых экспериментов с использованием eNK от 4 доноров. $*=p < 0,05$; $***=p < 0,001$; $****=p < 0,0001$; двухфакторный ANOVA.

На фигуре 2, которая представляет стабильность связывания между полипептидами Fc SDH, Fc LALA и Fc WT, и рецептором Fc (CD16A) CD16⁺/CD56⁺/CD45⁺/CD3⁻ eNK-клеток: Результаты являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов с использованием NK-клеток от 4 доноров на сутки 2 и 3, 3 доноров на сутки 7. График 2A представляет собой гистограмму, представляющую результаты для маркера A647. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных к полипептидам (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), (ii) Fc LALA A647, (iii) Fc WT A647, (iv) Fc SDH A647. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции A647. График 2B. Y-ось: Процент Fc⁺ (CD16⁺) eNK-клетки через 2 суток (светло-серый), 3 суток (средне-серый) и 7 суток (темно-серый) инкубации. X-ось: eNK-клетки, прикрепленные к полипептидам (слева направо) (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647 и (iii) Fc SDH A647. График 2C. Y-ось: Средняя интенсивность флуоресценции A647 через 2 суток (светло-серый), 3 суток (средне-серый) и 7 суток (темно-серый) инкубации при 37°C. X-ось: eNK-клетки, прикрепленные к полипептидам (слева направо) (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647 и (iii) Fc SDH A647.

На фигуре 3, которая представляет условия насыщения рецептора Fc на CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ eNK-клетках посредством полипептидов Fc SDH и Fc WT: График 3A представляет собой гистограмму, представляющую условия насыщения рецептора Fc eNK-клеток посредством полипептида Fc WT A647 или Fc SDH A647 при 0, 1, 10, 20, 30 или 40 мкг/мл. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), к (ii) 1 мкг/мл, (iii) 10 мкг/мл, (iv) 20 мкг/мл, (v) 30 мкг/мл или (vi) 40

мкг/мл полипептида Fc WT A647 или Fc SDH A647. X-ось: средняя интенсивность флуоресценции A647. График 3B представляет собой гистограмму, представляющую условия насыщения рецептора Fc eNK-клеток посредством полипептида Fc SDH A488 при 0, 1, 10, 20, 30 или 40 мкг/мл. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), к (ii) 1 мкг/мл, (iii) 10 мкг/мл, (iv) 20 мкг/мл, (v) 30 мкг/мл или (vi) 40 мкг/мл Fc SDH A488. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции A488. Результаты являются репрезентативными для одного эксперимента с использованием eNK от одного донора (2 псевдоповтора). График 3C представляет собой гистограмму, представляющую условия конкуренции за рецептор Fc, на eNK-клетках, вооруженных полипептидами Fc SDH A488, немеченых конкурирующих полипептидов Fc WT, Fc SDH, Fc блок и антитела против CD16 при 20 мкг/мл. Y-ось: Количество eNK-клеток, вооруженных полипептидами Fc SDH A488, инкубированных (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), (ii) без конкурента, (iii) с блокатором Fc блок, (iv) с Fc WT, (v) с Fc SDH и (vi) с антителом против CD16 при 20 мкг/мл в течение 1 час при 37°C. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) A488. График 3D представляет собой гистограмму, представляющую условия конкуренции за рецептор Fc eNK-клеток, вооруженных полипептидами Fc SDH A647, немеченых конкурирующих полипептидов Fc SDH, Fc блок и антитела против CD16 при 20 мкг/мл. Y-ось: Количество eNK-клеток, вооруженных полипептидами Fc SDH A647, инкубированных (сверху вниз) (i) без Fc (только клетки), (ii) без конкурента, (iii) с блокатором Fc блок, (iv) с Fc SDH и (v) с антителом против CD16 при 20 мкг/мл. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) A647. Результаты являются репрезентативными для одного эксперимента с использованием eNK от одного донора в 2 повторах.

На фигуре 4, которая представляет цитотоксичность и уровень дегрануляции eNK-клеток, вооруженных антителами Fc SDH или Fc WT, применительно к выживаемости клеток для клеток из линии клеток рака молочной железы BT20: График 4A. Y-ось: Выживаемость клеток, выраженная в процентах клеток-мишеней BT20 после 1 час инкубации с eNK-клетками, вооруженными в течение 1 час и подвергнутыми одному циклу промывки для наблюдения только вооруженных eNK-клеток. X-ось: клетки-мишени BT20, инкубированные (слева направо) (i) без вооруженных eNK-клеток, (ii) с невооруженными eNK-клетками, (iii) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела WT, (iv) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела SDH, (v) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела WT, и (vi) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела SDH, без промывки (то есть, присутствуют свободные антитела). График 4B. Y-ось: Процент выживаемости клеток для клеток BT20 после 1 час инкубации с eNK-клетками, вооруженными в течение 1 час и без промывки (позволяет наблюдение эффекта вооруженных eNK-клеток, но также свободных Fc). X-ось: Клетки-мишени BT20, инкубированные (слева направо) (i) без вооруженных eNK-клеток, (ii) с невооруженными eNK-клетками, (iii) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела

WT, (iv) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела SDH, (v) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела WT, (vi) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела SDH. График является репрезентативным для 3 независимых экспериментов с использованием eNK от 4 доноров.

График 4С. Y-ось: Выживаемость клеток, выраженная в процентах клеток-мишеней BT20 после 1 час инкубации с eNK-клетками, вооруженными в течение 24 час. X-ось: Клетки-мишени BT20, инкубированные (слева направо) (i) без вооруженных eNK-клеток, (ii) с невооруженными eNK-клетками, (iii) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела WT, (iv) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 10 мкг/мл антитела SDH, (v) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела WT, и (vi) с eNK-клетками, вооруженными с использованием 1 мкг/мл антитела SDH.

График 4D. Вооруженные eNK-клетки, размещенные в присутствии клеток-мишеней (нижний график) или в отсутствие клеток-мишеней (верхний график 4D). Y-ось: Экспрессия CD107a на поверхности вооруженных eNK-клеток, выраженная в процентах. X-ось (слева направо): eNK-клетки, вооруженные (i) без антитела, с использованием (ii) 10 мкг/мл антитела Fc WT, (iii) 10 мкг/мл антитела Fc SDH, (iv) 1 мкг/мл антитела Fc WT, (v) 1 мкг/мл антитела Fc SDH. Результаты являются репрезентативными для двух независимых экспериментов с использованием eNK от 3 доноров.

На фигуре 5, которая представляет присутствие антител (трастузумаба) Fc SDH и Fc WT на поверхности мембраны вооруженных eNK-клеток: График 5А. Y-ось: Количества eNK-клеток (сверху вниз) (i) в комбинации с антителами, присутствующими на поверхности мембраны, и (ii) в комбинации с антителами, присутствующим в внутриклеточном домене. X-ось: средняя интенсивность флуоресценции (MFI) маркера антитела против Fc IgG, связанного (слева направо) (i) без антитела, (ii) с антителом Fc WT, (iii) с антителом Fc SDH. Графики 5В и 5С представляют собой гистограммы, представляющие собой условия конкуренции за рецептор Fc (CD16A) eNK-клеток, вооруженных с использованием меченных A488 (график 5В) или A647 (график 5С) антител Fc SDH, против (i) полипептида Fc блок; (ii) антитела против CD32; (iii) антитела против CD16, клон B73.1; (iv) антитела против CD16. Y-ось: Количество eNK-клеток, вооруженных полипептидом Fc SDH, инкубированных (сверху вниз) (i) без Fc, (ii) без конкурента, (iii) с полипептидом Fc блок, (iv) с антителом против CD32, (v) с антителом против CD16, клон B73.1, и (vi) с антителом против CD16. X-ось: средняя интенсивность флуоресценции (MFI) Fc A488 (график 5В) и Fc A647 (график 5С). Результаты являются репрезентативными для одного эксперимента с использованием eNK-клеток от одного донора (2 псевдоповтора на донора).

На фигуре 6 представлена экспрессия рецептора CD16 на поверхности eNK-клеток, вооруженных (i) без Fc, (ii) антителом Fc LALA A647, (iii) антителом Fc WT A647 или (iv) антителом Fc SDH A647. Результаты являются репрезентативными для 3 экспериментов с использованием eNK-клеток от одного донора. График 6А представляет собой гистограмму, представляющую результаты для поверхностных маркеров CD16 на

вооруженных $CD56^+/CD45^+/CD3^-$ NK-клетках. Y-ось: Количество eNK-клеток, вооруженных (сверху вниз) (i) без Fc, (ii) антителом Fc LALA A647, (iii) антителом Fc WT A647, (iv) антителом Fc SDH A647. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции CD16. График 6B представляет собой график, представляющий собой экспрессию поверхностных маркеров CD16 на вооруженных $CD56^+/CD45^+/CD3^-$ eNK-клетках. Y-ось: Экспрессия в процентах маркера CD16 на вооруженных eNK-клетках. X-ось: eNK-клетки, вооруженные (слева направо) (i) без антитела Fc, (ii) антителом Fc LALA A647, (iii) антителом Fc WT A647, (iv) антителом Fc SDH A647, через 2, 3 и 7 суток для каждого условия.

На фигуре 7A, которая представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образце перитонеальной жидкости, отобранном у взрослой мыши Swiss-nude: Y-ось: Количество $CD45^+$ (слева), $CD56^+$ (в середине), $CD16^{-/низкий}$ или $CD16^+$ (справа) вооруженных eNK-клеток. X-ось: Гранулометрическое измерение (i) SSC-A (слева), CD16 (в середине), Fc A647 (справа) клеток.

На фигуре 7B, которая представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образце перитонеальной жидкости, отобранном у взрослой мыши Swiss-nude: Сравнение клеток Fc A647⁺ среди тотальных $CD45^+/CD56^+$ eNK-клеток до и после инъекции *in vivo*. Y-ось: Количество eNK-клеток, прикрепленных (сверху вниз), (i) без полипептида Fc, (ii) к полипептиду Fc SDH A647, до инъекции, (iii) к полипептиду Fc SDH A647 через 24 час после инъекции. X-ось: средняя интенсивность флуоресценции A647.

На фигуре 7C, которая представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образцах крови, костного мозга (график 7C) и селезенки (график 7D) взрослой мыши Swiss-nude: Y-ось: Количество $CD45^+$ клеток в образце крови (слева) или костного мозга (справа). X-ось: средняя интенсивность флуоресценции SSC-A.

На фигуре 7D, которая представляет стабильность связывания *in vivo* eNK-клеток - Fc SDH в образцах крови, костного мозга (график 7C) и селезенки (график 7D) взрослой мыши Swiss-nude: Y-ось: Количество меченных A647 $CD45^+$ (слева) и $CD16^{-/низкий}$ или $CD16^+$ (счет, справа) клеток в образце селезенки. X-ось: Средняя интенсивность флуоресценции SSC-A (слева), Fc A647 (справа).

Фигура 8 представляет два иллюстративных варианта осуществления рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению.

На фигуре 9A, которая представляет аффинность связывания *in vitro* рекомбинантного антитела Fc SD (A), Fc IE (B), Fc SDIE (C), Fc AL (D), Fc ALIE (E), Fc GASD (F), Fc GASDALIE (G), Fc GASDIE (H), Fc SDALIE (I), Fc SDHFIE (J), Fc SDSTIE (K) и Fc SDH (L), по сравнению с формой антитела Fc WT, с CD16a и CD16b. График представляет аффинность для CD16a (светло-серый) и CD16b (темно-серый), по сравнению с эталонным значением для рекомбинантного антитела Fc WT (RTX-WT). Y-ось: Кратность улучшения аффинности, по сравнению с Fc WT (RTX-WT). X-ось: (слева направо) антитело Fc WT (RTX-WT), антитело Fc SD (RTX A), антитело Fc IE (RTX-B), антитело Fc SDIE (RTX-C), антитело Fc AL (RTX-D), антитело Fc ALIE (RTX-E), антитело

Fc GASD (RTX-F), антитело Fc GASDALIE (RTX-G), антитело Fc GASDIE (RTX-H), антитело Fc SDALIE (RTX-I), антитело Fc SDHFIE (RTX-J), антитело Fc SDSTIE (RTX-K) и антитело Fc SDH (RTX-L).

На фигуре 9B, которая представляет кинетику связывания на CD16+ клетках, т.е., eNK-клетках, различных рекомбинантных антител Fc от 1 час до 72 час после вооружения антителами CD16+ клеток. График представляет процент CD56⁺/CD45⁺/CD16⁺/CD3⁻ eNK-клеток, с покрытой антителом Fc WT (RTX-WT) или каждым из рекомбинантных антител Fc поверхностью, через 1 час, 24 час, 48 час или 72 час после вооружения. Y-ось: Процент частоты eNK-клеток, вооруженных каждым из рекомбинантных антител Fc. X-ось: eNK-клетки, вооруженные (слева направо) антителом Fc WT (RTX-WT), антителом Fc SD (RTX-A), антителом Fc IE (RTX-B), антителом Fc SDIE (RTX-C), антителом Fc AL (RTX-D), антителом Fc ALIE (RTX-E), антителом Fc GASD (RTX-F), антителом Fc GASDALIE (RTX-G), антителом Fc GASDIE (RTX-H), антителом Fc SDALIE (RTX-I), антителом Fc SDHFIE (RTX-J), антителом Fc SDSTIE (RTX-K), антителом Fc SDH с аллотипом G1m17,1 (RTX-L-R) и антителом Fc SDH с аллотипом nG1m1 (RTX-L-T) через 1 час, 24 час, 48 час (за исключением RTX-L-T, не определяли) и 72 час. График является репрезентативным для 3 независимых экспериментов с использованием NK-клеток от 4 доноров.

На фигуре 10, которая представляет CD16+ клетки, т.е., eNK-клетки, вооруженные совместно двумя различными антителами, содержащими мутацию Fc SDH в домене C_H2. CD56⁺/CD45⁺/CD16⁺/CD3⁻ eNK-клетки анализировали с использованием антител против трастузумаба (Y-ось: Количество CD56⁺/CD45⁺/CD16⁺/CD3⁻ eNK-клеток, вооруженных трастузумабом-Fc SDH) или с использованием антител против ритуксимаба (X-ось: Количество CD56⁺/CD45⁺/CD16⁺/CD3⁻ eNK-клеток, вооруженных ритуксимабом-Fc SDH). Левая панель: eNK-клетки не являлись вооруженными; Средние панели: eNK-клетки являлись вооруженными только RTX-SDH или только TRAST-SDH; Правая панель: eNK-клетки являлись вооруженными как RTX-SDH, так и TRAST-SDH. RTX-SDH соответствует рекомбинантному ритуксимабу Fc SDH, и TRAST-SDH соответствует рекомбинантному трастузумабу Fc SDH.

На фигуре 11, которая представляет эффективность ex vivo CD16+ клеток, т.е., eNK-клеток, вооруженных рекомбинантным ритуксимабом Fc SDH, для CD20+ клеток злокачественных опухолей. Y-ось: Процент опосредованной специфическим антителом цитотоксичности, индуцированной NK-клетками, вооруженными RTX-SDH, для первичных злокачественных клеток В-лимфомы после 16 час инкубации. X-ось: Образцы от пациентов от 1 до 7. График является репрезентативным для 4 независимых экспериментов с использованием NK-клеток от 4 доноров.

Подробное описание

Как подробно объяснено в примерах далее в настоящем описании, авторы настоящего изобретения отметили, что NK-клетка, вооруженная с использованием рекомбинантного полипептида, содержащего (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, являлась стабильной с

течением времени в физиологических условиях *in vitro*, но также *in vivo* у мышей. Конкретно, показано, что рекомбинантный полипептид не может быть вытеснен или заменен в физиологических условиях, когда рекомбинантным полипептидом вооружены НК-клетки. Более конкретно, авторы настоящего изобретения показали способность этих НК-клеток, вооруженных с использованием рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению, к индукции сильной цитотоксичности против клеток-мишеней рака молочной железы BT20.

В контексте настоящего изобретения, НК-клетка (естественный киллер) представляет собой пример CD16+ клетки, как описано в настоящем описании.

Преимущественно, НК-клетки, аллогенные или аутологичные, относительно нуждающегося в них индивидуума, по настоящему изобретению, можно использовать для лечения или предотвращения любого заболевания, связанного с клеточным нарушением в организме.

Термины, использованные в настоящем описании, использованы со своим общепринятым значением в рассматриваемой области техники, и относительно контекста описания, в котором использованы термины. Конкретные термины дополнительно обсуждают ниже в настоящем описании или в другом месте в настоящем описании, для предоставления дополнительных указаний, относительно изобретения и его применения. Следующие определения представлены для описания и формулы изобретения.

Описание различных вариантов осуществления изобретения содержит варианты осуществления, включающие «содержащий», «имеющий», «состоящий из» и «в основном состоящий из». Термины «иметь» и «содержать», или варианты, такие как «имеет», «имеют», «содержит» или «содержащий», следует понимать, как предусматривающие включение указанного элемента или элементов (таких как один элемент композиции или одна стадия способа), но не исключение других элементов. Термин «состоящий из» предусматривает включение указанного элемента или элементов, исключая любой дополнительный элемент. Выражение «в основном состоящий из» предусматривает включение указанных элементов, и потенциально, других элементов, когда другие элементы не оказывают существенного влияния на новые и фундаментальные характеристики изобретения. В соответствии с контекстом, термин «содержать» может также строго предусматривать указанные характеристики, целые числа, стадии или компоненты и, следовательно, в этом случае, он может быть заменен на «состоять из».

Термин «около» или «приблизительно», в рамках изобретения, применительно к числовому значению, относится к общепринятому интервалу погрешности для рассматриваемого значения, как обычно определяет специалист в рассматриваемой области техники. Использование термина «приблизительно», применительно к конкретному значению или параметру, включает и описывает как таковые это значение или этот параметр. Термин «приблизительно» относится к $\pm 10\%$ от данного значения. Однако, каждый раз, когда рассматриваемое значение относится к неделимому объекту,

который может утратить свою идентичность при дальнейшем разделении, тогда «приблизительно» относится к ± 1 неделимый объект.

Термин «индивидуум» или «пациент», в рамках изобретения, в частности, обозначает млекопитающее. Рассматриваемые млекопитающие включают, но без ограничения, домашних животных (например, быков, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, человека и нечеловекообразных приматов), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В соответствии с конкретным вариантом осуществления, индивидуум или пациент, представляет собой человека.

В контексте настоящего изобретения, термины «предотвращать», «предотвращение» (и варианты этих выражений), применительно к физиологическому нарушению или заболеванию, относится к профилактическому лечению заболевания или нарушения, например, у индивидуума, как подозревают, имеющего это заболевание или нарушение, или подверженного риску развития этого заболевания или нарушения. Предотвращение включает, но без ограничения, предотвращение или замедление развития заболевания, и/или поддержание одного или нескольких симптомов заболевания на желательном уровне или меньшем уровне. Термин «предотвращать» не требует 100% исключения правдоподобия или вероятности возникновения заболевания или нарушения. Вместо этого, этот термин обозначает уменьшение до меньшей степени риска или вероятности возникновения данного феномена. Как указано, предотвращение может являться полным, то есть, представляет собой отсутствие поддающихся детекции симптомов или заболевания, или частичным, так что присутствует меньшее количество симптомов, или симптомы являются менее тяжелыми.

В контексте настоящего изобретения, термины «терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» относятся к количеству, которое обеспечивает терапевтическое преимущество в лечении, предотвращении или управлении течением рассматриваемых патологических состояний. Конкретное количество, которое является терапевтически эффективным, может быть легко определено врачом и может изменяться, в зависимости от таких факторов, как тип и стадия рассматриваемых патологических состояний, медицинский анамнез, пол, масса и возраст пациента, диета пациента и введение других лекарственных средств.

В соответствующем настоящему изобретению смысле, термин «значимый» или любой производный термин, используемый в контексте изменения, означает, что наблюдаемое изменение является заметным или имеет статистическую значимость.

В контексте настоящего изобретения, термины «осуществление лечения», «лечение», «терапия» или «терапевтический» относятся к введению или употреблению внутрь активного ингредиента, то есть, вооруженной NK-клетки по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей такой активный ингредиент, для целей излечения, облегчения, уменьшения или ослабления, или улучшения заболевания или патологического нарушения, или одного или нескольких ассоциированных симптомов, или для предотвращения или замедления прогрессирования

этого симптома или симптомов, или этого заболевания, или для остановки развития этого симптома или симптомов, или этого заболевания или этого патологического нарушения, статистически значимым образом. Более конкретно, «осуществление лечения» или «лечение» включает любой способ получения благоприятного эффекта или желательного результата, применительно к заболеванию у индивидуума. Обеспечивающие преимущество или желательные клинические результаты могут включать, но без ограничения, ослабление или улучшение заболевания или одного или нескольких симптомов такого заболевания; сокращение или уменьшение степени заболевания, стабилизацию, то есть, отсутствие ухудшения заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания; предотвращение заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания; предотвращение распространения заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания; замедление заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания, или прогрессирования одного или нескольких симптомов такого заболевания; сокращение рецидива ассоциированного заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания; и прерывания заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания. Иными словами, «лечение», в рамках изобретения, включает любое восстановление, улучшение, уменьшение или прерывание заболевания, или одного или нескольких симптомов такого заболевания. «Уменьшение» симптома или заболевания означает сокращение тяжести или частоты заболевания или симптома, или прекращение заболевания или симптома.

Как используют в настоящем описании и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если иначе и явно не указано в контексте.

«Фармацевтически приемлемый» или «физиологически приемлемый» означает, что носитель (переносчик, разбавитель или наполнитель) должен являться совместимым с другими ингредиентами состава и нетоксичным для индивидуума, для введения которому предназначена содержащая его композиция. Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой носитель, известный как удовлетворительный, конкретно, в соответствии с критериями безопасности, совместимости и инертности, необходимыми для применения в области фармацевтики. В качестве примера фармацевтически приемлемого носителя, можно упомянуть стерильную воду, сахариды, такие как сукроза или сахароза, крахмалы, сахарные спирты, такие как сорбит, полимеры, такие как PVP или PEG, смазывающие средства, такие как стеарат магния, консерванты, окрашивающие средства или вкусоароматические средства.

В контексте настоящего изобретения, выражение «физиологически приемлемый носитель» предназначено для обозначения любого вещества или композиции, совместимых с организмом индивидуума, для введения которому предназначен активный ингредиент по изобретению. В частности, физиологически приемлемый носитель представляет собой вещество или композицию, введение которой индивидууму не сопровождается значительными неблагоприятными эффектами. Он может представлять

собой, например, нетоксичный растворитель, такой как вода или водный солевой раствор. В частности, такой носитель является совместимым с пероральным или ректальным введением, и является, предпочтительно, адаптированным для перорального введения.

Список источников, ингредиентов и компонентов, указанный далее в настоящем описании, понимают как описанный таким образом, что любая их комбинация и смесь также предусмотрена в контексте настоящего изобретения.

Любое максимальное количественное ограничение, приведенное в настоящем описании, понимают как включающее любое более низкое количественное ограничение, как если бы эти более низкие количественные ограничения были записаны явно. Любое минимальное количественное ограничение, приведенное в настоящем описании, содержит любое более высокое количественное ограничение, как если бы эти более высокие количественные ограничения были записаны явно в настоящем описании. Любой числовой интервал, приведенный на протяжении настоящего описания, содержит любой более узкий числовой интервал, включенный в такой более широкий числовой интервал, как если бы эти более узкие числовые интервалы все были записаны явно.

Любой список, указанный в настоящем описании, например, такой как списки ингредиентов, предназначен и должен быть рассмотрен в качестве групп Маркуша. Таким образом, любой список можно читать и предусматривать как элементы, «выбранные из группы, состоящей из»... список элементов... «и их комбинации и смеси».

Далее в настоящем описании может быть приведена ссылка на торговые наименования компонентов, содержащих некоторые ингредиенты, используемые в настоящем описании. Авторы настоящего изобретения не имеют намерения ограничиваться материалами с конкретным торговым наименованием. Материалы (например, материалы, полученные из отличного источника с отличным наименованием или идентификационным номером), эквивалентные материалам, указанным в настоящем описании посредством торгового наименования, могут служить заменой и быть использованы далее в настоящем описании.

Термин «парентеральное введение» обозначает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, посредством инъекции, посредством внутривенного, внутримышечного, внутриартериального, интратекального, интракапсулярного, интраорбитального, внутрисердечного, внутрикожного, внутрибрюшинного, транстрахеального, подкожного, эпидермального, внутрисуставного, субкапсулярного, субарахноидального, интраспинального, эпидурального и интратерального способов, включая, без ограничения, инъекции и перфузии.

В контексте настоящего изобретения, «процент идентичности» между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями, в соответствующем настоящему изобретению смысле, предназначен для обозначения процента нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются идентичными между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, полученного после наилучшего выравнивания (оптимального выравнивания), этот процент является

исключительно статистическим, и различия между двумя последовательностями случайным образом распределены на протяжении их длины. Сравнения последовательности между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями общепринятым образом проводят, сравнивая эти последовательности после оптимального выравнивания; указанное сравнение можно проводить по фрагментам или посредством «окна сравнения». Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, в отличие от сравнения вручную, посредством программного обеспечения для сравнения, такого как BLAST. Таким образом, «процент идентичности последовательности по меньшей мере приблизительно 70%» конкретно включает процент идентичности последовательности по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

В рамках изобретения, «+», при использовании для указания присутствия конкретного клеточного маркера, означает, что клеточный маркер поддается детекции посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток, выше, чем для контроля изотипа, или поддается детекции выше фона в количественной или полуколичественной RT-ПЦР, или с использованием любых других хорошо известных способов, позволяющих детекцию маркера.

В контексте настоящего изобретения, «CD16+ клетки» обозначает клетку или популяцию клеток, которая является «+»/«положительной» по FcγRIII/CD16, и относится к поддающемуся детекции присутствию на или в клетке FcγRIII/CD16. CD16+ клетка происходит из любого источника, предпочтительно, млекопитающего и более предпочтительно, человека. «CD16+ клетка» также относится к немодифицированным клеткам, естественным образом экспрессирующим FcγRIII/CD16, или к клеткам, временно модифицированным для обеспечения экспрессии или сверхэкспрессии FcγRIII/CD16, или к клеткам, стабильно трансформированным для экспрессии или сверхэкспрессии FcγRIII/CD16. Временные или стабильные модификации относятся к модификациям, хорошо известным из научных знаний, таким как, но без ограничения, подвергание клеток воздействию химического или биологического реагента(ов) или к клеткам, генетически модифицированным посредством трансфекции нуклеотидными средствами). Например, термин «CD16+ клетки» включает клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки и макрофаги.

В контексте настоящего изобретения, «вооруженные CD16+ клетки» обозначает CD16+ клетку, предпочтительно, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, более предпочтительно, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; содержащим (i) модифицированную область Fc или ее вариант, предпочтительно, содержащую модифицированный домен C_H2, и (ii) лигандсвязывающий домен.

«Вооруженные CD16+ клетки» обозначает соединение конструкции (C), такой как: [CD16+ клетка] - [Рекомбинантный полипептид формулы (I)]. Таким образом,

«вооруженная CD16+ клетка» охватывает соединение конструкции (**D**): [CD16+ клетка] - [[Модифицированная область Fc] - [Линкер]_x - [Лигандсвязывающий домен]].

В каждой из конструкций **C** или **D**, рекомбинантный полипептид формулы (I) не является прикрепленным к CD16+ клетке посредством ковалентной связи. В отличие от этого, в каждой из конструкций (**C**) или (**D**), пептид формулы (I) является прикрепленным к CD16+ клетке нековалентным способом, в частности, посредством ассоциации типа рецептор/лиганд рецептора.

В контексте настоящего изобретения, «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически узнает и связывает один или несколько антигенов. Антитело может представлять собой полноразмерное антитело или любой его антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любой белок или пептид, содержащий по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, имеющий биологическую активность для связывания антигена. Один пример включает, но без ограничения, определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой/легкой цепи или ее лигандсвязывающую часть, переменную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасную (FR) область или любую ее часть, или по меньшей мере часть связывающего белка. Термин антитело также охватывает полипептид или полипептидный комплекс, имеющий способность связывания антигена при активации. Термин «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения, представляет собой часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) и т.п.; например, диатела. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с таким же антигеном, какой узнает интактное антитело.

Другие лигандсвязывающие домены, и альтернативы «фрагменту антитела» могут включать лиганды на основе нуклеиновых кислот, такие как аптамеры и шпигельмеры.

Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или полученный способами генной инженерии белок или полипептид, который действует подобно антителу, посредством связывания со специфическим антигеном с формированием комплекса. Антитело, антигенсвязывающий полипептид, или его вариант или производное по настоящему изобретению, включает, но без ограничения, поликлональное антитело, моноклональные антитело, мультиспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело или химерное антитело, одноцепочечное антитело, эпитопсвязывающий фрагмент (например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv)), одноцепочечное антитело, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), фрагмент, содержащий домен VK или VH, фрагмент, полученный из экспрессирующей библиотеки Fab, и анти-Id антитело (включая, например, анти-Id антитело и антитело LIGHT, описанные в настоящем описании). Молекула иммуноглобулина или антитела по изобретению может представлять собой

молекулу иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), вида (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подтипа.

В контексте настоящего изобретения, «лигандсвязывающий домен из антитела» относится к последовательности, способной к связыванию с лигандом-мишенью, таким как вещество-мишень, соединение-мишень, молекула-мишень или даже клетка-мишень, (i) например, лигандсвязывающий домен, который является способным к связыванию со специфическим антигеном клетки-мишени, или к последовательности, способной к связыванию с естественным или опухолевым антигеном, такой как антигенсвязывающий домен антитела, который является способным к связыванию с указанной мишенью, или (ii) например, лигандсвязывающий домен, который является способным к связыванию с клеточным рецептором или к связыванию с антигенсвязывающим доменом антитела, в этом случае, лигандсвязывающий домен содержит антиген или состоит из антигена, узнаваемого антигенсвязывающим доменом указанных антител.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен», или «лигандсвязывающий домен из антитела», в рамках изобретения, относится, в частности, к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с данным антигеном/лигандом. Функции связывания антигена антителом могут осуществлять фрагменты интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, входящих в термин антигенсвязывающий фрагмент антитела, включают фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент Fab', одновалентный фрагмент состоящий из доменов VL, VH, CL, CH1 и шарнирной области; фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab', связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH одного плеча антитела; фрагмент однодоменного антитела (sdAb) (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), состоящий из домена VH или домена VL; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодированы отдельными генами, их можно соединять, с использованием рекомбинантных способов, посредством искусственного пептидного линкера, позволяющего получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спарены для образования одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (ScFv); см., например, Bird et al., 1989 Science 242:423-426; и Huston et al., 1988 proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). «dsFv» представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный посредством дисульфидной связи. Двухвалентные и мультивалентные фрагменты антител либо могут формироваться спонтанно посредством ассоциации одновалентных scFv, либо могут быть получены путем соединения одновалентных scFv посредством пептидного линкера, например, двухвалентные sc(Fv)₂. Такие одноцепочечные антитела включают одно или несколько из антигенсвязывающих частей или фрагментов антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалисту в данной области, и фрагменты подвергают скринингу по полезности таким же способом, как интактные антитела.

Унитело представляет собой другой тип фрагмента антитела, лишенный шарнирной области антител IgG4. Делеция шарнирной области приводит к получению молекулы, имеющей по существу половину размера традиционных антител IgG4 и имеющей одновалентную связывающую область вместо двухвалентной связывающей области антител IgG4. Антигенсвязывающие фрагменты можно включать в однодоменные антитела, SMIP, максиантитела, миниантитела, интраантитела, диатела, триотела и тетраантитела (см., например, Hollinger and Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136). Термин «диатела» «триотела» или «тетраантитела» относится к небольшим фрагментам антител с мультивалентными антигенсвязывающими участками (2, 3 или четыремя), где фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). Посредством использования линкера, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждают спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих участка. Антигенсвязывающие фрагменты можно включать в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных фрагментов Fv (VH-CH1-VH-CH1), которые, вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи, формируют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., 1995 *Protein Eng.* 8(10); 1057-1062 и Патент США No. 5641870).

Fab по настоящему изобретению можно получать посредством обработки антитела, которое вступает в специфическую реакцию с являющимся мишенью антигеном/лигандом, с использованием протеазы, папаина. Также, Fab можно получать посредством вставки ДНК, кодирующей Fab антитела, в вектор для прокариотической системы экспрессии, или для эукариотической системы экспрессии, и введения вектора в прокариоту или эукариоту (по необходимости) для экспрессии Fab.

F(ab')₂ по настоящему изобретению можно получать посредством обработки антитела, которое вступает в специфическую реакцию с антигеном-мишенью, с использованием протеазы, пепсина. Также, F(ab')₂ можно получать посредством связывания Fab', описанного ниже, посредством тиоэфирной связи или дисульфидной связи.

Fab' по настоящему изобретению можно получать посредством обработки F(ab')₂, который вступает в специфическую реакцию с антигеном-мишенью, с использованием восстанавливающего средства, дитиотреитола.

В контексте настоящего изобретения, «поверхностный белок FcγRIIIa/CD16a» относится к активирующему рецептору CD16a, также известному как FcγRIIIa, в основном экспрессирующемуся на клеточной поверхности иммуноцитов. CD16a представляет собой активирующий рецептор, запускающий антителозависимую цитотоксическую активность иммуноцитов. Например, клетки с поверхностным белком FcγRIIIa/CD16a включают клетки естественные киллеры (NK), подгруппы моноцитов, дендритные клетки и редкие Т-клетки.

В контексте настоящего изобретения, «поверхностный белок FcγRIIIb/CD16b» относится к активирующему рецептору CD16b, также известному как FcγRIIIb, в основном экспрессирующемуся на клеточной поверхности лейкоцитов. Например, клетки с поверхностным белком FcγRIIIb/CD16b включают NK-клетки и клетки нейтрофилы.

В контексте настоящего изобретения, «вооруженная NK-клетка» обозначает NK-клетку, предпочтительно, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; содержащим (i) модифицированную область Fc или ее вариант, предпочтительно, содержащие модифицированный домен C_H2 и (ii) лигандсвязывающий домен.

«Вооруженная NK-клетка» обозначает соединение конструкции (A), такой как: [NK-клетка] - [Рекомбинантный полипептид формулы (I)]. Таким образом, «вооруженная NK-клетка» включает соединение конструкции (B): [NK-клетка] - [[Модифицированная область Fc] - [Линкер]_x - [Лигандсвязывающий домен]].

В каждой из конструкций A или B, рекомбинантный полипептид формулы (I) не является прикрепленным к NK-клетке посредством ковалентной связи. В отличие от этого, в каждой из конструкций (A) или (B), пептид формулы (I) является прикрепленным к NK-клетке нековалентным способом, в частности посредством ассоциации типа рецептор/лиганд рецептора.

В полипептиде формулы (I), содержащем звено «лигандсвязывающего домена», указанный «лиганд» может принадлежать к любому типу, при условии, что (i) указанный лигандсвязывающий домен, содержащийся в рекомбинантном полипептиде формулы (I), является способным к связыванию указанного лиганда.

В конкретных вариантах осуществления полипептида формулы (I), лигандсвязывающий домен может состоять из молекулы, узнаваемой рецептором, например, молекулы, узнаваемой рецептором, экспрессированным клеткой-мишенью, или даже молекулы, узнаваемой антигенсвязывающим доменом антитела. В последнем случае, лигандсвязывающий домен, содержащийся в рекомбинантном полипептиде формулы (I), узнаваемый антигенсвязывающим доменом антитела, может также быть обозначен как «антиген».

В других вариантах осуществления полипептида формулы (I), лигандсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен антитела. В этих других вариантах осуществления, лиганд представляет собой молекулу, узнаваемую указанным связывающим доменом антитела, такую как молекула, экспрессируемая клеткой-мишенью, например, опухолевый антиген-мишень, маркерный белок клетки-мишени или даже рецептор клетки-мишени.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, представляет собой специфическую форму полипептида, содержащую домен Fc, содержащий по меньшей мере один лигандсвязывающий домен, имеющий, или сохраняющий, значительную гомологию по меньшей мере с одним из переменных доменов тяжелой или легкой цепи антитела по меньшей мере одного вида антител животных. Константные

последовательности подклассов IgG человека дикого типа классифицированы в базе данных UniProt, доступной онлайн, под наименованиями P01857 (IgG1), P01859 (IgG2), P01860 (IgG3) и P01861 (IgG4). В настоящем описании, выражение «область Fc IgG1 человека дикого типа» относится к областям Fc IgG1 человека, которые могут быть проиллюстрированы аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO. 15 или фрагментом этой SEQ ID NO. 15.

В настоящем описании, выражение «область Fc IgG1 человека дикого типа» также может относиться к областям Fc IgG1 человека, которые могут быть проиллюстрированы аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO. 16 или фрагментом этой SEQ ID NO. 16.

В настоящем описании, выражение «домен C_H2 IgG1 человека дикого типа» относится к части областей Fc IgG1 человека, которые могут быть проиллюстрированы аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO. 1 или фрагментом этой SEQ ID NO. 1.

Конкретно, SEQ ID NO. 15 или SEQ ID NO. 16 содержат SEQ ID NO. 1.

SEQ ID NO 16. содержит SEQ ID NO. 17.

«Лиганд области Fc IgG» обозначает молекулу, предпочтительно, полипептид, подходящую для связывания области Fc типа IgG, в частности, типа IgG1, антитела, с формированием нековалентного комплекса. Неограничивающим образом, такие лиганды Fc включают полипептиды FcγRs, FcRn, C1q, C3, связывающего маннан лектина, рецептора маннозы, стафилококкового белка A, стрептококкового белка G и FcγR вирусного происхождения. Лиганды Fc, в частности, включают гомологи рецептора Fc (FcRH), (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136).

«Рецептор Fcγ» или «рецептор Fc» или «FcγR», или «Fc-гамма-R», обозначает любой член семейства белков, кодируемый геном FcγR и подходящий для связывания области Fc типа IgG, и более конкретно, типа IgG1, антитела. У человека, это семейство включает, без ограничения, FcγRI (CD64), включающий изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и изоформы FcγRIII (CD16), включая FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158), и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2). FcγR может происходить из любого вида организма, включая, конкретно, человека, мышей, крыс и обезьян.

Наиболее подходящими рецепторами FcγR для узнавания модифицированной области Fc по настоящему изобретению являются рецепторы FcγRIII (CD16) и их изоформы.

«Область Fc» обозначает, полностью или частично, фрагмент Fc или «область кристаллизующегося фрагмента (область Fc)» антитела, которая, как правило, состоит из константной части тяжелой цепи, за пределами шарнирной части, содержащей домен C_H2 и C_H3, то есть, соответственно, «константный домен 2 тяжелой цепи» и «константный домен 3 тяжелой цепи». Также, этот термин включает последние две константные области

иммуноглобулинов типа IgA, IgD и IgE, последние три константные области иммуноглобулинов типа IgM и IgE, так же как N-концевую шарнирную часть указанных областей.

Конкретно, это обозначает, полностью или частично, фрагмент Fc антитела человека типа IgG, и наиболее конкретно, антитела типа IgG1.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, указанная область Fc может содержать, полностью или частично, область C_H2 - C_H3, область C_H2 или область C_H3.

«Модифицированная область Fc», или «вариант области Fc», обозначает полипептидную последовательность, соответствующую модифицированной форме эталонной области Fc, такой как эталонная область Fc IgG1 человека. Таким образом, модифицированная область Fc, в соответствующем настоящему изобретению смысле, отличается от эталонной последовательности фрагмента Fc антитела, в частности, фрагмента Fc IgG1 человека, одной или несколькими модификациями аминокислот. Такая модифицированная область может относиться, в равной степени, к рекомбинантному полипептиду, к композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей указанный рекомбинантный полипептид.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет по меньшей мере одну модификацию аминокислот, относительно указанной эталонной последовательности (в частности, указанной эталонной последовательности IgG1 человека), включая по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или более пяти модификаций, относительно указанной эталонной последовательности. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет по меньшей мере 70% идентичность последовательности, относительно указанного эталона (в частности, указанной эталонной последовательности IgG1 человека).

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет подвергнутую модуляции аффинность, в отношении поверхностного белка FcγRIII (CD16), экспрессированного CD16+ клетками.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет увеличенную или уменьшенную аффинность, в отношении поверхностного белка FcγRIII (CD16), экспрессированного CD16+ клетками.

В соответствии с конкретными предпочтительными и иллюстративными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет подвергнутую модуляции аффинность, в отношении поверхностного белка FcγRIII (CD16), экспрессированного NK-клетками, или, где это применимо, любым их предшественником.

В частности, в соответствии с некоторыми из этих вариантов осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет увеличенную аффинность, в отношении поверхностного белка FcγRIII (CD16), экспрессированного NK-клетками, или, где это применимо, любым их предшественником.

В соответствии с конкретными альтернативными вариантами осуществления, указанная модифицированная область Fc имеет уменьшенную аффинность, в отношении поверхностного белка FcγRIII (CD16), экспрессированного NK-клетками, или, где это применимо, любым их предшественником.

Для всех положений, обсуждаемых в контексте предшествующего изобретения, и применительно к модификациям в области Fc, таким, как определенные в последовательностях SEQ ID NO. 2-14, относительно SEQ ID NO. 1, и если не указано иное, приведена ссылка на нумерацию EU посредством ссылки на Edelman (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, содержание которого приведено в качестве ссылки). В частности, указанная модификация может представлять собой добавление, делецию или замену. Замена может включать конкретно любую природную или неприродную аминокислоту.

Полипептидная последовательность, содержащая «1-100 аминокислот» включает, конкретно, аминокислотную последовательность из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100 аминокислот.

В контексте настоящего изобретения, «модификация аминокислоты» обозначает замену, вставку и/или делецию аминокислоты в полипептидной последовательности. «Замена аминокислоты», или «замена», обозначает замену аминокислоты в конкретном положении в полипептидной последовательности дикого типа на другую аминокислоту. Например, замена S239D относится к варианту полипептида, в этом случае, к варианту Fc, где серин в положении 239 заменен на аспарагиновую кислоту. «Вставка аминокислоты», или «вставка», в соответствующем настоящему изобретению смысле, представляет собой добавление аминокислоты в конкретной локализации в исходной полипептидной последовательности. Например, вставка G > 235-236 обозначает вставку глицина между положениями 235 и 236. «Делеция аминокислоты», или «делеция», в настоящем описании обозначает исключение на уровне аминокислоты в исходной полипептидной последовательности. Например, G236 обозначает делецию глицина в положении 236.

«Положение» в настоящем описании означает локализацию в белковой или полипептидной последовательности. Положения могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с разработанным форматом, например, индексом EU, таким как в Kabat. Для любого положения в способах по настоящему изобретению, нумерация приведена в соответствии с нумерацией EU, относящейся к нумерации EU антитела (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). Соответствие с нумерацией Kabat можно установить посредством соответствующей таблицы; IMGT unique numbering for C-DOMAIN (http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html).

«IgG» в настоящем описании означает полипептид, принадлежащий к классу антител, в основном кодируемых известным геном иммуноглобулина гамма. У человека, этот IgG содержит подклассы или изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей, IgG содержат IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. «Изотип» в настоящем описании означает любой подкласс иммуноглобулинов, определенный посредством химических и антигенных характеристик его константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека являются следующими: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD и IgE.

«Антителозависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» обозначает форму цитотоксичности, при которой секретируемые Ig связываются с рецепторами Fc (FcγR), присутствующими на конкретных цитотоксических клетках (например, на клетках естественных киллеров (NK)), и позволяют указанным цитотоксическим клеткам специфически связываться с антигеном для разрушения клетки-мишени с использованием цитотоксинов. Антитела IgG, специфические для лигандов, подвергаемых нацеливанию на поверхности клетки-мишени, стимулируют цитотоксические клетки и являются необходимыми для такого уничтожения. Лизис мишеней происходит вне клеток, требует непосредственного контакта между клетками, и не вовлекает никаких компонентов комплемента. Способность любого антитела или полипептида опосредовать лизис клетки-мишени посредством ADCC можно тестировать. Для оценки ADCC, представляющее интерес антитело добавляют к клеткам-мишеням, представляющим лиганд-мишень, в комбинации с эффекторными клетками, которые могут быть активированы посредством комплексов антиген-антитело (например, NK-клетками), что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз, как правило, детектируют по высвобождению маркеров (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей (A647 или A688) или естественных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. Эффекторные клетки, которые можно использовать для этих анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Конкретные примеры тестов ADCC *in vitro* описаны в Wisecarver et al., 1985, 19: 211; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166:1351; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258:183; Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184:29. Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющих интерес антител можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описанная в Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652.

«Клетка-мишень» в настоящем описании означает клетку, экспрессирующую антиген-мишень, который может быть узнан вооруженной NK-клеткой по настоящему изобретению, или клетку, экспрессирующую антитело, способное узнавать антиген, представленный вооруженной NK-клеткой по настоящему изобретению. Например, клетка-мишень может представлять собой клетку злокачественной опухоли, инфицированную патогенным агентом клетку, аутореактивную В-клетку, аутореактивную Т-клетку.

«Дикий тип или WT» означает в настоящем описании аминокислотную последовательность, обнаруженную в природе, включая аллельные варианты. Белок,

полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG и т.д. WT, имеет аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была преднамеренно модифицирована.

Рекомбинантный полипептид

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному полипептиду, подходящему для прикрепления к NK-клетке или предшественнику NK-клетки.

Этот рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), которая улучшает свойства связывания рекомбинантного полипептида, относительно такого же полипептида в форме дикого типа, и (ii) лигандсвязывающий домен. Например, полипептид, содержащий такую модифицированную область Fc, имеет увеличенную стабильность и специфичность связывания, по отношению к рецептору Fc, более конкретно, по отношению к рецептору FcγRIII (CD16). Кроме того, рекомбинантный полипептид, содержащий такую модифицированную область Fc, обеспечивает стабилизацию указанного полипептида на клеточной мембране, ингибируя его интернализацию. Таким образом, рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению представляют собой оптимизированные варианты исходного немодифицированного полипептида, то есть, полипептида дикого типа. Более точно, рекомбинантный полипептид содержит (i) область Fc, состоящую из константной части тяжелой цепи, за пределами шарнирной части, содержащей два домена C_H2 и C_H3 (домен C_H2 и/или домен C_H3), позволяющую прикрепление к рецепторам Fc, и (ii) область, способную к связыванию с лигандом, позволяющую узнавание клеток-мишеней.

В контексте антител IgG, каждый из изотипов IgG имеет три области СН. Следовательно, домены «СН» в контексте IgG являются следующими: «С_H1» относится к положениям 118-215, в соответствии с нумерацией EU. «С_H2» относится к положениям 231-340, в соответствии с нумерацией EU, и «С_H3» относится к положениям 341-446, в соответствии с нумерацией EU.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению имеет формулу (I):

[Модифицированная область Fc] - [Линкер]_x - [Лигандсвязывающий домен],

где:

- [модифицированная область Fc] выбрана из различных вариантов осуществления модифицированной области Fc и/или модифицированного домена C_H2 модифицированной области Fc, как определено в настоящем описании,

- X представляет собой целое число, равное 0 или 1;

- [Линкер] содержит полипептидную последовательность, имеющую 1-100 аминокислот;

- [Лигандсвязывающий домен] содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью, таким как вещество-мишень, соединение-мишень, молекула-мишень или даже клетка-мишень, (i) например, лигандсвязывающий домен,

который является способным к связыванию со специфическим антигеном клетки-мишени, или последовательность, способную к связыванию с естественным или опухолевым антигеном, такую как антигенсвязывающий домен антитела, который является способным к связыванию с указанной мишенью или (ii) например, лигандсвязывающий домен, который является способным к связыванию с клеточным рецептором или к связыванию с антигенсвязывающим доменом антитела, в этом случае, лигандсвязывающий домен содержит антиген или состоит из, антигена, узнаваемого антигенсвязывающим доменом указанных антител.

Модифицированная область Fc может представлять собой аминокислотную последовательность дикого типа, имеющую одну или несколько (например, 1-10 или более) аминокислотных замен или делеций, относительно аминокислотной последовательности дикого типа, например, в шарнирной области или C_H2, или C_H3. Таким образом, аминокислотная последовательность области Fc имеет идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более (то есть, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) с аминокислотной последовательностью области Fc полипептида дикого типа (например, со ссылкой на домен C_H2 IgG1 человека, обозначенный как «Fc WT» и содержащий SEQ ID NO. 1).

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью области Fc полипептида дикого типа (например, SEQ ID NO. 15 или, альтернативно, SEQ ID NO. 16). Аминокислотная последовательность может дополнительно содержать другие модификации, например, уменьшающие формирование дисульфидных связей. В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc и/или домен C_H2 модифицированной области Fc содержит замену одной или нескольких аминокислот, относительно области Fc IgG человека дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с доменом C_H2 IgG человека, например, доменом C_H2 IgG1 человека дикого типа. Домен C_H2 может содержать другие модификации (например, уменьшающие или прекращающие эффекторную функцию).

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с доменом C_H3 домен IgG, например, доменом C_H3 IgG1 человека дикого типа. Домен C_H3 может дополнительно содержать другие модификации для придания специфических аллотипов. С одной стороны, домен C_H3 может содержать модификации, относительно отличного аллотипа IgG1 человека дикого типа. В конкретных случаях, домен C_H3 соответствует аминокислотной последовательности домена C_H3 IgG1 человека дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 230, 233, 234, 235, 236, 239, 240, 243, 264, 266, 268, 272, 274, 275, 276, 278, 302, 318, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332 и 335, где нумерация аминокислот в области Fc приведена в соответствии с нумерацией EU. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления, указанная модифицированная область Fc содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из: P230E, P230Y, P230G, E233N, E233Q, E233K, E233R, E233S, E233T, E233H, E233A, E233V, E233L, E233I, E233F, E233M, E233Y, E233W, E233G, L234K, L234R, L234S, L234A, L234M, L234W, L234P, L234G, L234A, L235E, L235K, L235R, L235A, L235A, L235M, L235W, L235P, L235G, G236D, G236E, G236A, G236N, G236Q, G236K, G236R, G236S, G236T, G236H, G236A, G236V, G236L, G236I, G236F, G236M, G236Y, G236W, G236P, S239Q, S239K, S239R, S239V, S239L, S239I, S239M, S239D, S239W, S239P, S239G, F243E, V264D, V264E, V264N, V264Q, V264K, V264R, V264S, V264H, V264W, V264P, V264G, H268D, H268E, H268Q, H268K, H268R, H268T, H268V, H268L, H268I, H268F, H268M, H268W, H268P, H268G, E272D, E272R, E272T, E272H, E272V, E272L, E272F, E272M, E272W, E272P, E272G, K274D, K274N, K274S, K274H, K274V, K274I, K274F, K274M, K274W, K274P, K274G, F275L, N276D, N276T, N276H, N276V, N276I, N276F, N276M, N276W, N276P, N276G, 278D, Y278N, Y278Q, Y278R, Y278S, Y278H, Y278V, Y278L, Y278I, Y278M, Y278P, Y278G, E318Q, E318H, E318L, E318Y, S324H, S324F, S324M, S324W, S324P, S324G, S324T, N325K, N325R, N325S, N325F, N325M, N325Y, N325W, N325P, N325G, K326P, A327E, A327K, A327R, A327H, A327V, A327I, A327F, A327M, A327Y, A327W, A327P, L328D, L328Q, L328K, L328R, L328S, L328T, L328V, L328I, L328Y, L328W, L328P, L328G, P329D, P329E, P329N, P329Q, P329K, P329G, P329R, P329S, P329T, P329H, P329V, P329L, P329I, P329M, P329Y, P329W, P329G, A330E, A330L, A330N, A330T, A330P, A330G, P331D, P331Q, P331R, P331T, P331L, P331I, P331F, P331M, P331Y, P331W, I332K, I332R, I332S, I332E, I332V, I332L, I332F, I332M, I332W, I332P, I332G, E333L, E333F, E333M, E333P, K334P, T335N, T335S, T335H, T335V, T335L, T335I, T335F, T335M, T335W, T335P, T335G, где нумерация аминокислот в области Fc приведена в соответствии с нумерацией EU.

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc и/или домен C_H2 модифицированной области Fc содержит аминокислотную замену S239D, в соответствии с нумерацией EU, относительно области Fc WT, то есть, домена C_H2 IgG1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO. 1).

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc и/или домен C_H2 модифицированной области Fc содержит аминокислотную замену I332E, в соответствии с нумерацией EU, относительно области Fc WT, то есть, домена C_H2 IgG1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO. 1).

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc и/или домен C_H2 модифицированной области Fc содержит аминокислотную замену S324T, в

H268F, A330L и G236A, в соответствии с нумерацией EU, относительно области Fc WT, то есть, домена C_H2 IgG1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO. 1).

В конкретных вариантах осуществления, модифицированная область Fc и/или домен C_H2 модифицированной области Fc содержит аминокислотные замены I332E, S324T, H268F и A330L, в соответствии с нумерацией EU, относительно области Fc WT, то есть, домена C_H2 IgG1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO. 1).

В конкретных вариантах осуществления, варианты модифицированной области Fc выбраны из группы, состоящей из S239D/H268F/S324T/I332E, S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/S324T/I332E, S239D/H268F/I332E, A330L, A330L/I332E, G236A/S239D, G236A/S239D/A330L/I332E, G236A/S239D/I332E, L234A/L235A/P329G, где нумерация остатков в области Fc приведена в соответствии с нумерацией EU.

В конкретных вариантах осуществления, аминокислотная последовательность модифицированной области Fc и/или домена C_H2 модифицированной области Fc соответствует аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO. 2-13.

В конкретных альтернативных вариантах осуществления, варианты модифицированной области Fc **не** включают модификацию A330, такую как A330L, где нумерация остатков в области Fc приведена в соответствии с нумерацией EU.

Предпочтительно, [модифицированная область Fc] полипептида формулы (I) выбрана из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO. 2-13.

В предпочтительном варианте осуществления, аминокислотная последовательность модифицированной области Fc и/или домена C_H2 модифицированной области Fc соответствует аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO. 2, обозначенной как область Fc SDH.

В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению содержит модифицированную область Fc, где домен C_H2 содержит или не содержит другие модификации.

В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению содержит модифицированную область Fc, где домен C_H3 включает или не включает модификации.

В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению содержит модифицированную область Fc, где шарнирная область может представлять собой шарнирную область IgG1 дикого типа с заменами или без замен.

В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению содержит модифицированную область Fc, где (a) домен C_H2 содержит одну или несколько модификаций, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, или (b) домен C_H3 содержит одну или несколько модификаций, относительно домена C_H3 IgG1 человека дикого типа, или (c) два домена C_H2 и C_H3 содержат одну или

несколько модификаций, относительно домена C_H2 и C_H3 IgG1 человека дикого типа, соответственно.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению, содержащийся в нем лигандсвязывающий домен содержит, включая, но без ограничения, белки, субъединицы, домены, мотивы и/или эпитопы, принадлежащие к следующему списку мишеней: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозина A1, A33, ACE, ACE-2, активин, активин А, активин АВ, активин В, активин С, RIA активина, RIA активина ALK-2, RIB активина ALK-4, RIIA активина, RIIВ активина, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адрессины, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, альфа-1-антитрипсин, антагонист альфа-V/бета-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический фактор, интегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 остеогенин, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, бомбезин, нейротрофический фактор кости, BPDE, BPDE-ADN, BTC, фактор комплемента 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонин, cAMP, карциноэмбриональный антиген (CEA), ассоциированный с карциномой антиген, катепсин А, катепсин В, катепсин С/DPPI, катепсин D, катепсин Е, катепсин Н, катепсин L, катепсин О, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (белки р67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, токсин Clostridium botulinum, токсин Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMVUL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, опухолеассоциированный антиген цитокератин, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, фактор ускорения распада, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 головного мозга), Dhh, дигоксин, DNAM-1, ДНКазы, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, рецептор эндотелина, энкефалиназа, eNOS, Eot, эотаксин 1, EpCAM, эфрин B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-селектин, AND-1, фактор Па, фактор

VII, фактор VIIIc, фактор IX, белок активации фибробластов (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолликулостимулирующий гормон, фракталкин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (миостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-альфа1, GFR-альфа2, GFR-альфа3, GTR, глюкагон, Glut 4, гликопротеин IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, высвобождающий гормон роста фактор, гаптен (NP-сар или NIP-сар), HB-EGF, HCC, оболочечный гликопротеин gB HCMV, оболочечный гликопротеин gH HCMV, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Her B gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген (HMWMAA), HIV gp120, петля gp 120 HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, миозин сердца человека, цитомегаловирус человека (HCMV), гормон роста человека (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, связывающие IGF белки, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, интерферон (INF)-альфа, INF-бета, INF-гамма, ингибин, iNOS, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин альфа2, интегрин альфа3, интегрин альфа4, интегрин альфа4/бета1, интегрин альфа4/бета7, интегрин альфа5 (альфаV), интегрин альфа5/бета1, интегрин альфа5/бета3, интегрин альфа6, интегрин бета1, интегрин бета2, интерферон гамма, IP-10, I-TAC, JE, калликреин 2, калликреин 5, калликреин 6, калликреин 11, калликреин 12, калликреин 14, калликреин 15, калликреин L1, калликреин L2, калликреин L3, калликреин L4, KC, KDR, фактор роста кератиноцитов (KGF), ламинин 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), латентный TGF-1, латентный TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, антиген Lewis-Y, родственный Lewis-Y антиген, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопротеины, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, легочный сурфактант, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина бета, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, металлопротеазы, рецептор MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-альфа, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, мюллерова ингибирующая субстанция, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-кадгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, неприлизин, нейтрофин-3, -4 или -6, нейртулин, нейрональный фактор роста (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, паратиреоидный гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP), PIGF, PLP, PP14, проинсулин, прорелаксин, белок C, PS,

PSA, PSCA, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, А-цепь релаксина, В-цепь релаксина, ренин, респираторный (лиганд TRANCE/RANK ODF, OPG лиганд), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 лиганд, DR3 лиганд), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ЛИГАНД HVEM LIGHT, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR лиганд AITR лиганд, TL6), TNFSF1A (TNF-а конектин, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 лиганд gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 лиганд CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas лиганд Apo-1 лиганд, APT1 лиганд), TNFSF7 (CD27 лиганд CD70), TNFSF8 (CD30 лиганд CD153), TNFSF9 (4-1 BB лиганд CD137 лиганд), TP-1, t-PA, Тро, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, опухолеассоциированный антиген CA 125, опухолеассоциированный антиген, экспрессирующий родственный Lewis Y углевод, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VEкадгерин-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, вирусные антигены, VLA, VLA-1, VLA-4, интегрин VNR, фактор фон Виллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, и рецепторы гормонов и факторов роста, и т.д.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению, содержащийся в нем лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с лигандом, определенным посредством, но без ограничения, белков, субъединиц, доменов, мотивов и/или эпитопов, принадлежащих к следующему списку мишеней: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозина A1, A33, ACE, ACE-2, активин, активин А, активин АВ, активин В, активин С, RIA активина, RIA активина ALK-2, RIB активина ALK-4, RIIA активина, RIIB активина, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адрессины, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, альфа-1-антитрипсин, антагонист альфа-V/бета-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический фактор, интегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 остеогенин, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, бомбезин, нейротрофический фактор кости, BPDE, BPDE-ADN, BTC, фактор комплемента 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонин, cAMP, карциноэмбриональный антиген (CEA), ассоциированный с карциномой антиген, катепсин А, катепсин В, катепсин С/DPPI, катепсин D, катепсин Е, катепсин Н, катепсин L, катепсин О, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1,

CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (белки p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, токсин *Clostridium botulinum*, токсин *Clostridium perfringens*, CKb8-1, CLC, CMV, CMVUL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, опухолеассоциированный антиген цитокератин, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, фактор ускорения распада, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 головного мозга), Dhh, дигоксин, DNAM-1, ДНКаза, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, рецептор эндотелина, энкефалиназа, eNOS, Eot, эотаксин 1, EpCAM, эфрин B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-селектин, AND-1, фактор IIa, фактор VII, фактор VIIIc, фактор IX, белок активации фибробластов (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолликулостимулирующий гормон, фракталин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (миостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-альфа1, GFR-альфа2, GFR-альфа3, GTR, глюкагон, Glut 4, гликопротеин IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, высвобождающий гормон роста фактор, гаптен (NP-сар или NIP-сар), HB-EGF, HCC, оболочечный гликопротеин gB HCMV, оболочечный гликопротеин gH HCMV, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Her B gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген (HMWMAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 loop, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, миозин сердца человека, цитомегаловирус человека (HCMV), гормон роста человека (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, связывающие IGF белки, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, интерферон (INF)-альфа, INF-бета, INF-гамма, ингибин, iNOS, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин альфа2, интегрин альфа3, интегрин альфа4, интегрин альфа4/бета1, интегрин альфа4/бета7, интегрин альфа5 (альфаV), интегрин альфа5/бета1, интегрин альфа5/бета3, интегрин альфа6, интегрин бета1, интегрин бета2,

интерферон гамма, IP-10, I-TAC, JE, калликреин 2, калликреин 5, калликреин 6, калликреин 11, калликреин 12, калликреин 14, калликреин 15, калликреин L1, калликреин L2, калликреин L3, калликреин L4, KC, KDR, фактор роста кератиноцитов (KGF), ламинин 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), латентный TGF-1, латентный TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, антиген Lewis-Y, родственный Lewis-Y антиген, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопроотеины, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, легочный сурфактант, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина бета, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, металлопротеазы, рецептор MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-альфа, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, мюллерова ингибирующая субстанция, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-кадгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, неприлизин, нейтрофин-3, -4 или -6, нейртулин, нейрональный фактор роста (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, паратиреоидный гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP), PIGF, PLP, PP14, проинсулин, прорелаксин, белок C, PS, PSA, PSCA, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, А-цепь релаксина, В-цепь релаксина, ренин, респираторно-синцитиальный вирус (RSV) F, RSV Fgp, Ret, ревматоидные факторы, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, сывороточный альбумин, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (опухолеассоциированный гликопротеин-72), TARC, TCA-3, Т-клеточные рецепторы (например, Т-клеточный рецептор альфа/бета), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, тестикулярная PLAP-подобная щелочная фосфатаза, TfR, TGF, TGF-альфа, TGF-бета, TGF-бета панспецифический, TGF-бета RI (ALK-5), TGF-бета RII, TGF-бета RIIb, TGF-бета RIII, TGF-бета1, TGF-бета2, TGF-бета3, TGF-бета4, TGF-бета5, тромбин, Ck-1 тимуса, тиреостимулирующий гормон, Tie, TIMP, TIQ, тканевой фактор, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-альфа, TNF-альфа-бета, TNF-бета2, TNFc, TNF-RI, TNF-II, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB

CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (лиганд Apo-2 TRAIL, TL2), TNFSF11 (лиганд TRANCE/RANK ODF, OPG лиганд), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 лиганд, DR3 лиганд), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ЛИГАНД HVEM LIGHT, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR лиганд AITR лиганд, TL6), TNFSF1A (TNF-а конектин, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-б LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 лиганд gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 лиганд CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas лиганд Apo-1 лиганд, APT1 лиганд), TNFSF7 (CD27 лиганд CD70), TNFSF8 (CD30 лиганд CD153), TNFSF9 (4-1 BB лиганд CD137 лиганд), TP-1, t-PA, Тро, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, опухолеассоциированный антиген CA 125, опухолеассоциированный антиген, экспрессирующий родственный Lewis Y углевод, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VE-кадгерин-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, вирусные антигены, VLA, VLA-1, VLA-4, интегрин VNR, фактор фон Виллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, и рецепторы гормонов и факторов роста, и т.д.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления рекомбинантного полипептида, лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с молекулой-мишенью, такой как антитело. В соответствии с этим вариантом осуществления, лигандсвязывающий домен является подходящим для связывания с антителом, и наиболее конкретно, с вариабельной областью антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления, рекомбинантный полипептид по изобретению, то есть, полипептид, имеющий (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, который является способным к связыванию с лигандом, не является антителом.

В частности, в соответствии с одним вариантом осуществления, рекомбинантный полипептид по изобретению, то есть, полипептид, имеющий (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, не имеет вариабельную или гипервариабельную область антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления, рекомбинантный полипептид по изобретению, то есть, полипептид, имеющий (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником, может представлять собой антитело.

В одном варианте осуществления, рекомбинантный полипептид по изобретению может представлять собой полностью человеческое антитело или гуманизированное антитело, и кроме того, по сравнению с таким же антителом, не имеющим модифицированную область Fc, оно может иметь одно или несколько улучшенных или

модифицированных свойств. Эти свойства включают специфичность связывания, по отношению к рецептору FcγRIII NK-клеток или любой клетке, экспрессирующей этот рецептор FcγRIII, или улучшение антителозависимой клеточной цитотоксичности.

В конкретных вариантах осуществления, когда рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению представляет собой антитело, или его фрагмент, он может представлять собой исходное антитело, которое имеет известную структуру, и часть Fc которого была модифицирована, как определено в настоящем описании. Исходное антитело, имеющее известную структуру, может быть выбрано из абаговомаба, абатацепта, абциксимаба, абитузумаба, абрилумаба, актоксумаба, адалимумаба, адекватумаба, адуканумаба, афлиберцепта, афутузумаба, алацизумаба, алефацепта, алемтузумаба, алирокумаба, альтумаба, аматуксимаба, анатумаба, анетумаба, анифромумаба, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумаба, аскринвакумаба, аселизумаба, атезолизумаба, атинумаба, атлизумаба, аторолимумаба, бапинеизумаба, базиликсимаба, бавитуксимаба, бектумаба, бегеломаба, белатацепта, белиумаба, бенрализумаба, бертилимумаба, бесилесумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, бициромаба, бимагрумаба, бимекизумаба, биватузумаба, блинатумаба, блосозумаба, бокоцизумаба, брентуксимаба, бриаксумаба, бродалумаба, бролуцизумаба, брентицизумаба, канакинумаба, кантузумаба, каплацизумаба, капромаба, карлумаба, катумаксумаба, цеделизумаба, цертолизумаба, цетуксимаба, цитатузумаба, циксутумаба, клазаксумаба, кленоликсимаба, кливатузумаба, кодритузумаба, колтуксимаба, конатумаба, концизумаба, кренезумаба, дацетузумаба, даклизумаба, далотузумаба, дапиролизумаба, даратумаба, дектрекумаба, демцизумаба, денинтузумаба, деносумаба, дерлотуксимаба, детумаба, динутуксимаба, диридавумаба, дорлиумаба, дрозитумаба, дупилумаба, дурвалумаба, дусигитумаба, экромексимаба, экулизумаба, эдобакомаба, эдреколомаба, эфализумаба, эфунгумаба, элделумаба, элгемумаба, элотузумаба, элсилиумаба, эмактузумаба, эмибетузумаба, энаватузумаба, энфортумаба, энлиумаба, эноблитузумаба, эноксизумаба, энотикумаба, энситуксимаба, эпитуумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, эртумаксумаба, этанерцепта, этарацизумаба, этролизумаба, эвинакумаба, эволокумаба, эксбивирумаба, фанолесумаба, фаралиумаба, фарлетузумаба, фазимумаба, фелвизумаба, фезкимумаба, фиклатузумаба, фигитумаба, фиривумаба, фланвотумаба, флетикумаба, фонтолизумаба, форалумаба, форавирумаба, фрезолиумаба, фулраумаба, футуксимаба, галиксимаба, ганитумаба, гантинерумаба, гавилиумаба, гемтузумаба, гевокизумаба, гирентуксимаба, глембатумаба, голиумаба, гомиликсимаба, гуселкумаба, ибализумаба, ибритуумаба, икрукумаба, идаруцизумаба, иговомаба, ималумаба, имциромаба, имгатузумаба, инклакумаба, индатуксимаба, индусатумаба, инфликсимаба, интетумаба, инолиумаба, инотузумаба, ипилиумаба, иратумаба, изатуксимаба, итолизумаба, иксекизумаба, келиксимаба, лабетузумаба, ламбролизумаба, лампализумаба, лебрикизумаба, лемалезумаба, лензилумаба, лерделиумаба, лексатумаба, либивирумаба, лифастузумаба, лигелизумаба, лилотомаба, линтузумаба, лирилумаба, лоделцизумаба, локиветумаба, лорвотузумаба,

лукатумумаба, лулизумаба, лумиликсимаба, лумретузумаба, мапатумумаба, маргетуксимаба, маслимомаба, маврилимумаба, матузумаба, меполизумаба, метелимумаба, милатузумаба, минретумомаба, мирветуксимаба, митумомаба, могамулизумаба, моролимумаба, мотавизумаба, моксетумомаба, муромонаба-CD3, наколомаба, намилумаба, наптумомаба, нарнатумаба, натализумаба, небакумаба, нецитумумаба, немолизумаба, нерелимомаба, несвакумаба, нимотузумаба, ниволумаба, нофетумомаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окаратузумаба, окрелизумаба, одулимомаба, офатумумаба, оларатумаба, олокизумаба, омализумаба, онартузумаба, онтуксизумаба, опицинумаба, опортузумаба, ореговомаба, ортикумаба, отеликсизумаба, отлертузумаба, окселумаба, озанезумаба, озорализумаба, пагибаксимаба, паливизумаба, панитумумаба, панкомаба, панобакумаба, парсатузумаба, пасколизумаба, пазотуксизумаба, патеклизумаба, патритумаба, пембролизумаба, пемтумомаба, перакизумаба, пертузумаба, пекселизумаба, пидилизумаба, пинатузумаба, пинтумомаба, полатузумаба, понезумаба, приликсимаба, притумумаба, квилизумаба, ракотумомаба, радретумаба, рафивирумаба, ралпанцизумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, рефанезумаба, регавирумаба, реслизумаба, рилонацепта, рилотумумаба, ринкукумаба, ритуксимаба, робатумумаба, роледумаба, ромосозумаба, ронтализумаба, ровелизумаба, руплизумаба, сацитузумаба, самализумаба, сарилумаба, сатумомаба, секукимумаба, серибантумаба, сетоксаксимаба, севирумаба, сибротузумаба, сифалимумаба, силтуксимаба, сиплизумаба, сирукумаба, софитузумаба, соланезумаба, солитомаба, сонепцизумаба, сонтузумаба, стамулумаба, сулесомаба, сувизумаба, табалумаба, такатузумаба, тадоцизумаба, тализумаба, танезумаба, таплитумомаба, тарекстумаба, тефибазумаба, телимомаба аритокса, тенатумомаба, тенеликсимаба, теплизумаба, тесидолумаба, TGN 1412, тицлимумаба, тилдракизумаба, тигатузумаба, TNX-650, тоцилизумаба, торализумаба, тосатоксумаба, тозитумомаба, товетумаба, тралокимумаба, трастузумаба, TRBS07, трегализумаба, тремелимумаба, тревогрумаба, тукотузумаба, тувирумаба, ублитуксимаба, улокуплумаба, урелумаба, уртоксазумаба, устекимумаба, вандортузумаба, вантуктумаба, вануцизумаба, вапаликсимаба, варлимумаба, вателизумаба, ведолизумаба, велтузумаба, вепалимомаба, весенкумаба, висилизумаба, волоциксимаба, ворсетузумаба, вотумумаба, залутумумаба, занолимумаба, затуксимаба, зиралимумаба, зив-афлиберцепта и золимомаба.

Клетки NK (естественные киллеры)

В одном из этих объектов, по настоящему изобретению используют клетку NK (естественный киллер), предпочтительно, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник NK-клетки.

NK-клетка представляет собой лимфоцит, способный к спонтанному разрушению клеток-мишеней, вовлекающему молекулы МНС класса 1. Специфичностью этих NK-клеток является способность к лизису пораженных заболеванием клеток без необходимости предшествующей активации и без контакта с патогенным агентом.

НК-клетки по настоящему изобретению могут происходить из любого источника, содержащего такие клетки. НК-клетки обнаружены во многих тканях и могут быть получены, например, из лимфатических узлов, селезенки, печени, легких, кишечника, децидуальной оболочки, и могут также быть получены из клеток iPS или из эмбриональных стволовых клеток (ESC). Как правило, пуповинную кровь, периферическую кровь, мобилизованную периферическую кровь и костный мозг, которые содержат гетерогенные популяции лимфоцитарных клеток, используют для предоставления большого количества НК-клеток для исследовательского и клинического применения.

Таким образом, в соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения, способ включает культивирование популяции НК-клеток, предпочтительно, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, происходящей из одного из следующих элементов: пуповинная кровь, периферическая кровь или костный мозг, и предпочтительно, пуповинная кровь. В конкретных вариантах осуществления, НК-клетки культивируют из гетерогенной популяции клеток, содержащей НК-клетки, $CD3^-$ клетки и $CD3^+$ клетки. В другом варианте, популяцию НК-клеток подвергают скринингу или обогащению, относительно НК-клеток. В конкретных случаях, НК-клетки можно размножать из свежих популяций клеток, в то время как в других случаях, размножают НК-клетки из помещенных на хранение популяций клеток (таких как криоконсервированные и размороженные клетки) или из предварительно культивированных популяций клеток.

НК-клетки являются ассоциированными с фракцией моноклеарных клеток из пуповинной крови или периферическая кровь или костный мозг. В одном варианте осуществления, популяция клеток, содержащая указанные НК-клетки, представляет собой популяцию моноклеарных клеток или популяцию тотальных ядросодержащих клеток, истощенную по $CD3^+$ клеткам или $CD3^+/CD19^+$ клеткам.

В другом варианте осуществления, популяция клеток, содержащая НК-клетки, представляет собой не подвергнутую скринингу популяцию НК-клеток. В другом варианте осуществления, клетки подвергают скринингу, и НК-клетки содержат $CD45^+/CD56^+/CD3^-$ и/или $CD45^+/CD56^+/CD3^-/CD16^+$ клетки. Способы скрининга НК-клеток на основании фенотипа (например, иммунодетекция и анализ посредством проточной цитометрии) хорошо известны специалисту в данной области.

Наиболее часто, образцы пуповинной крови или костного мозга затем обрабатывают для получения популяций клеток до помещения НК-клеток в культуральную среду (или буфер). Например, образец пуповинной крови можно обрабатывать для обогащения или очистки, или выделения специфических определенных популяций клеток. Термины «очищать» и «выделять» не требуют абсолютной чистоты; вместо этого, они представляют собой относительные термины. Таким образом, например, очищенная популяция НК-клеток представляет собой популяцию, где указанные клетки являются более обогащенными, чем клетки, обнаруженные в их исходной ткани. В

основном чистый препарат НК-клеток может являться обогащенным таким образом, что желательные клетки представляют по меньшей мере 50% от тотальных клеток, присутствующих в препарате. В конкретных типах препаратов, в основном чистая популяция НК-клеток представляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или более от тотальных клеток, присутствующих в препарате.

Способы обогащения и выделения лимфоцитов (CD45⁺ клеток) хорошо известны в данной области. Например, в соответствии с одним вариантом осуществления, эритроциты удаляют из биологического образца, чтобы сохранять только лимфоциты. В его наиболее простой форме, удаление эритроцитов может включать центрифугирование некоагулированной цельной крови или костного мозга. На основании плотности, эритроциты отделяют от лимфоцитов и других клеток. Фракции, богатые лимфоцитами, можно затем избирательно выделять. Лимфоциты и их предшественники можно также обогащать посредством центрифугирования с использованием сред для разделения, таких как стандартная среда для разделения лимфоцитов (LSM), доступная из нескольких коммерческих источников. Лимфоциты и их предшественники можно также обогащать с использованием нескольких способов, основанных на аффинности. Множество способов аффинного разделения на основе антител известны в данной области, такие как использование магнитных бусин, конъюгированных с антителами. Лимфоциты можно также обогащать посредством препаратов, доступных на рынке для отрицательного отбора нежелательных клеток, таких как ФИКОЛЛ-ГИПАК™ и другие среды с градиентом плотности, сформулированные для обогащения НК-клеток.

Способы отбора НК-клеток из образцов крови, костного мозга или ткани хорошо известны в данной области (см., например, US5770387 от Litwin et al.). Наиболее общеупотребительные способы основаны на выделении и очистке CD56⁺ клеток, как правило, после фракционирования моноклеарных клеток, и истощения не-НК-клеток, таких как CD3⁺, CD34⁺, CD133⁺ и т.д. Комбинации двух или более способов можно использовать для предоставления популяций НК-клеток, имеющих более высокую чистоту, относительно контаминантов не-НК. Наборы, доступные на рынке для выделения НК-клеток, предусматривают одностадийные способы (например, микробусины CD56 и наборы для выделения CD56⁺, CD56⁺/CD16⁺ от Miltenyi Biotec, Auburn CA) и способы из нескольких стадий, включая истощение или частичное истощение CD3⁺, или истощение с использованием антител против не-НК-клеток, узнающих и удаляющих Т-клетки (например, ОКТ-3), В-клетки, стволовые клетки, дендритные клетки, моноциты, гранулоциты и эритроидные клетки. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, НК-клетки подвергают скринингу по CD45⁺/CD56⁺CD3⁻, CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻/CD16⁺, CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻/CD16⁻, предпочтительно, CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻/CD16⁺.

Затем НК-клетки культивируют и сохраняют посредством любого способа, известного специалисту в данной области, до инкубации с рекомбинантными полипептидами по изобретению, получая вооруженные НК-клетки. НК-клетки можно

сохранять в течение вплоть до 7 суток, или вплоть до 3 недель до «вооружения». Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, популяцию НК-клеток культивируют в течение по меньшей мере 3, по меньшей мере 5, по меньшей мере 7, потенциально, 10, потенциально, 12, потенциально, 14, потенциально, 16, потенциально, 18, потенциально, 20 и потенциально, 21 суток, или 1, 2 или 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, или более.

Популяции НК-клеток можно культивировать посредством нескольких способов и устройств. Выбор устройства для культивирования, как правило, основан на масштабе и цели культивирования. Масштабирование культуры клеток, предпочтительно, подразумевает использование специально предназначенного для этого устройства. Устройства для продукции НК-клеток в крупном масштабе и с клиническим качеством подробно описаны, например, в Spanholtz et al. (PLoS ONE 2010; 5: e9221) и Sutlu et al. (Cytotherapy 2010, Early Online 1-12).

В конкретном варианте осуществления, НК-клетки, используемые по настоящему изобретению, представляют собой клетки от человека, отличного от индивидуума, подлежащего лечению, обозначенные как аллогенные.

В конкретном варианте осуществления, НК-клетки, используемые по настоящему изобретению, представляют собой клетки от самой или самого индивидуума, подлежащего лечению, обозначенные как аутологичные.

НК-клетка в комбинации с рекомбинантным полипептидом

В соответствии с одним из этих объектов, настоящее изобретение относится к НК-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или к предшественнику НК-клетки, прикрепленным к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc, способную к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником, и (ii) домен, способный к связыванию с антигеном; для применения в качестве лекарственного средства.

Два варианта осуществления рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению проиллюстрированы на фигуре 8. На левой стороне фигуры 8 представлен рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению, содержащий (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где лигандсвязывающий домен содержит антиген или состоит из антигена. На правой стороне фигуры 8 представлен рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению, содержащий (i) модифицированную область Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где лигандсвязывающий домен содержит, или состоит из антигенсвязывающего домена антитела. Таким образом, авторы настоящего изобретения воплотили универсальный продукт для клеточной терапии на основе НК-клеток. В отличие от CAR-T-клеток, специфичность для разрушения клеток-мишеней получают не посредством собственно НК-клеток, а посредством специфических пептидов, узнающих эти клетки-мишени. Настоящую комбинацию, НК-клетка - рекомбинантный полипептид, можно, таким образом,

распространять на все виды патологий, посредством разработки специфических полипептидов, специфически комбинируя специфический антиген с рекомбинантным полипептидом по изобретению.

Настоящее изобретение относится к соединениям конструкции (A), такой как:

[NK-клетка] - [рекомбинантный полипептид формулы (I)]

Настоящее изобретение относится к соединениям конструкции (B):

[NK-клетка] - [[Модифицированная область Fc] - [Линкер]_x - [Лигандсвязывающий домен]],

где [NK-клетка] представляет собой NK-клетку, как ранее определено в настоящем описании, [рекомбинантный полипептид формулы (I)] представляет собой полипептид или антитело, как ранее определено в настоящем описании.

В одном варианте осуществления, лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с лигандом типа антигена, где антиген может быть выбран из вирусных антигенов, антигенов опухоли, антигенов при инфекционном заболевании, аутоиммунных антигенов, токсинов или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления, лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с лигандом, который представляет собой конкатемер пептидов. В конкретных вариантах осуществления, лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с лигандом, выбранным из глутаматдекарбоксилазы 65 (GAD 65), природной ДНК, основного белка миелина, протеолипидного белка миелина, компонента рецептора ацетилхолина, тиреоглобулина, рецептора тиреотропного гормона (TSH) и цитруллинированных пептидов. В других конкретных вариантах осуществления, лигандсвязывающий домен является способным к связыванию с лигандом типа антигена, где антиген выбран из антигена злокачественной опухоли, антигена при инфекционном заболевании, выбранного из антигенов бактерии, вируса, паразита и гриба, антигена при аутоиммунном заболевании и их производных.

В соответствии с одним вариантом осуществления, антиген злокачественной опухоли, с которым лигандсвязывающий домен рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению является способным связываться, может представлять собой антиген злокачественной опухоли, выбранной из: меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака ободочной кишки, рака яичника, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рак кожи, злокачественной опухоли головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака тела матки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака тела матки, карциномы фаллопиевой трубы, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака пищевода, рака тонкой кишки, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака парашитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронических или острых лейкозов, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый

лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидных опухолей у детей, лимфоидной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или уретры, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-лимфоцитарной лимфомы, индуцированных условиями окружающей среды злокачественных опухолей и комбинаций указанных злокачественных опухолей.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антиген при инфекционном заболевании, с которым лигандсвязывающий домен рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению является способным связываться, может представлять собой антиген при инфекционном заболевании, выбранном из: (a) заболевания, выбранного из гриппа, герпеса, гиардиоза, малярии и лейшманиоза; (b) патогенной инфекции вирусом, выбранным из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита, вируса герпеса, аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, вируса HTLV, вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, вируса полиомиелита, вируса бешенства, вируса JC и вируса арбовирусного энцефалита; (c) патогенной инфекции бактерией, выбранной из *Chlamydia*, бактерий риккетсий, микобактерий, стафилококка, стрептококка, пневмококка, менингококка и гонококка, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Diphtheria*, *Salmonella*, *Bacilli*, бактерий, вызывающих холеру, столбняк, ботулизм, газовую гангрену, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма; (d) патогенной инфекции грибом, выбранным из *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, рода *Mucorales*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*; или (e) патогенной инфекции паразитом, выбранным из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, видов *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, видов *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антиген при аутоиммунном заболевании или его производное, с которым лигандсвязывающий домен рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению является способным связываться, может представлять собой антиген, выбранный из следующих заболеваний или производных: отторжение трансплантата органа, реакция трансплантат против хозяина, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, примитивный синдром Шегрена (или синдром Гужеро-Шегрена), аутоиммунные полиневропатии, такие как рассеянный склероз, диабет типа-I, аутоиммунный гепатит, анкилозирующий спондилит, синдром Рейтера, подагрический артрит, глютенчувствительная целиакия, болезнь Крона, тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, аутоиммунный гепатит, базедова болезнь, язвенный колит, васкулит, такой как ассоциированный с ANCA (антителами к

цитоплазме нейтрофилов) системный васкулит, аутоиммунные цитопении и другие гематологические осложнения у взрослых и детей, такие как острая или хроническая аутоиммунная тромбоцитопения, аутоиммунные гемолитические анемии, гемолитическая болезнь новорожденных (HDN), болезнь холодовых агглютининов, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и аутоиммунная приобретенная гемофилия, синдром Гудпасчера, экстрамембранозная нефропатия, аутоиммунные состояния жирной кожи, невосприимчивая миастения, смешанные криоглобулинемии, псориаз, ювенильный идиопатический артрит, воспалительный миозит, дерматомиозит и системные аутоиммунные состояния у детей, включая антифосфолипидный синдром.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антиген, с которым лигандсвязывающий домен рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению является способным связываться, может представлять собой антиген, выбранный из антигенов для следующих заболеваний или производных: тромбоцитемия, миелодиспластические синдромы, доброкачественные опухоли, и для удаления стареющих клеток.

В конкретных вариантах осуществления, вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению используют для лизиса клеток-мишеней, несущих антиген, который может быть узнан рекомбинантным полипептидом по изобретению, например, клеток злокачественных опухолей.

В конкретных вариантах осуществления, вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению используют для лизиса клеток-мишеней, которые узнают антиген, прикрепленный к рекомбинантному полипептиду по изобретению, например, аутореактивных В-клеток.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, вооруженные НК-клетки можно сохранять в течение вплоть до 7 суток, или вплоть до 3 недель до инъекции нуждающемуся в этом индивидууму. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, популяцию вооруженных НК-клеток культивируют в течение по меньшей мере 3, по меньшей мере 5, по меньшей мере 7, потенциально, 10, потенциально, 12, потенциально, 14, потенциально, 16, потенциально, 18, потенциально, 20 и потенциально, 21 суток, или 1, 2 или 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, или более. Иллюстративные и неограничивающие варианты длительности культивирования, как подробно описано в примерах заявки, составляют в течение по меньшей мере 3 суток и по меньшей мере 7 суток.

Фармацевтическая композиция

Настоящее изобретение относится также к композициям, конкретно, фармацевтическим композициям, содержащим НК-клетку (естественный киллер) или предшественник НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником,

сформулированные с фармакологически или фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем. Эти композиции могут содержать одну или несколько комбинаций НК-клеток, вооруженных рекомбинантными полипептидами по настоящему изобретению (например, две или более различных комбинаций). Например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем описании, может содержать комбинацию вооруженных НК-клеток, которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени или с антителами, имеющими комплементарные активности (или иммуноконъюгатами, или биспецифическими соединениями).

В конкретных случаях, композиция содержит по меньшей мере 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл, 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл вооруженных НК-клеток.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, можно также вводить в комбинированной терапии, то есть, в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать вооруженную НК-клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с по меньшей мере другим противопатогенным средством и/или стимулирующим средством для НК-клеток (например, активатором). Примеры лекарственных средств, которые можно использовать в комбинации, более подробно описаны далее в настоящем описании в разделе, относящемся к применению вооруженных НК-клеток, описанных в настоящем описании.

В конкретных случаях, фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут включать другие соединения, средства и/или лекарственные средства, используемые для лечения патологий, таких как злокачественная опухоль, аутоиммунное заболевание и его производные, или инфекционное заболевание. Эти соединения, средства и/или лекарственные средства могут включать, например, химиотерапевтические средства, низкомолекулярные средства или антитела, стимулирующие иммунный ответ против данной злокачественной опухоли.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» означает соль, сохраняющую желательную биологическую активность исходного соединения и не оказывающую нежелательных токсических эффектов. Кисотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли представляют собой примеры солей. Кисотно-аддитивные соли содержат нетоксичные неорганические кислоты, такие как соляная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, серная кислота, бромистоводородная кислота, иодистоводородная кислота, фосфорная кислота и моно- и дикарбоновые алифатические кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксисланы. Включены соли, происходящие из нетоксичных органических кислот, таких как кислоты, ароматические кислоты, ароматические и алифатические сульфоновые кислоты. Основно-аддитивные соли содержат, например, щелочноземельные металлы, такие как натрий, калий, магний и кальций, так же как N, N'-дибензилэтилендиамин, N-

метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и другие. Включены соли, происходящие из токсичных органических аминов.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут также включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.д., (2) маслорастворимые антиоксиданты, окисляющие средства, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и другие; и включены (3) хелаторы металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, виннокаменная кислота, фосфорная кислота и другие.

Примеры пригодных водных или неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описанных в настоящем описании, включают воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.д.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, сохраняя требуемый размер частиц, в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Эти композиции также могут содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов можно обеспечивать как посредством стерилизации, описанных в настоящем описании далее, так и посредством включения нескольких антибактериальных и противогрибковых средств, таких как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и другие. Может также являться желательным включение в композицию изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия. Кроме того, включение замедляющих абсорбцию средств, таких как моностеарат алюминия и желатин, может замедлять абсорбцию пригодных для инъекции фармацевтических форм.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления непосредственно перед использованием стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. Использование таких носителей и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда общепринятые среда или средство являются несовместимыми с активным ингредиентом, предусматривают их использования в фармацевтических композициях, описанных в настоящем описании. Добавочные активные вещества также можно включать в композиции.

Фармацевтическая композиция должна, как правило, являться стерильной и стабильной в условиях изготовления и хранения. Композицию можно составлять в форме раствора, микроэмульсии, раствора, микроэмульсии, липосомы или другой

упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, жидкий глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, и другие), и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством сохранения требуемого размера частиц, в случае дисперсии, и посредством использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях, может являться предпочтительным включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит и сорбит, или хлорида натрия. Замедленной абсорбции пригодных для инъекций композиций можно достигать посредством включения в композицию замедляющего абсорбцию средства, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные пригодные для инъекций растворы можно получать посредством включения активного соединения, то есть, вооруженных НК-клеток, в необходимом количестве в подходящий растворитель, потенциально, с одним из или с комбинацией ингредиентов, перечисленных далее в настоящем описании, затем стерилизации посредством микрофильтрации. Как правило, дисперсии получают, включая активное соединение в стерильный носитель, содержащий базовую дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных далее в настоящем описании. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекций растворов, предпочтительным способом получения является способ сушки в вакууме, где порошок активного ингредиента плюс любого другого желательного ингредиента получают из предварительно стерилизованного и фильтрованного раствора, и лиофилизация.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалами носителя для получения единичной дозированной формы, можно изменять в соответствии с субъектом, предназначенным для лечения, и конкретным способом введения. Количество активного ингредиента, то есть, вооруженных НК-клеток, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, как правило, представляет собой количество композиции, которое оказывает терапевтический эффект. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, количество активного ингредиента, то есть, вооруженных НК-клеток, составляет от приблизительно 0,01% до приблизительно 99%, относительно конечного количества композиции, предпочтительно, от приблизительно 0,1% до приблизительно 70%, относительно конечного количества композиции, по большей части, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Расписания дозирования корректируют для получения желательного оптимального ответа (например, терапевтического ответа). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, однократное болюсное введение является возможным, и несколько дробных доз можно вводить на протяжении длительного периода времени, или дозу

можно пропорционально уменьшать или увеличивать, в соответствии с показаниями для ожидаемой терапевтической ситуации. Предпочтительно, состав парентеральных композиций находится в форме единичных доз, конкретно, для облегчения введения и единообразия дозирования.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, единичная дозированная форма обозначает физическую единицу, которая является удобной в качестве единичной дозы для индивидуума, подлежащего лечению; каждая единица, в ассоциации с необходимым фармацевтическим носителем, оказывает желательный терапевтический эффект.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, для введения вооруженных НК-клеток в комбинации с антигеном или без антигена, доза лежит в диапазоне между приблизительно 0,0001 и 100 мг, более обычно, между 0,01 и 5 мг на кг массы тела хозяина. Например, доза содержится между 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или 1-10 мг/кг.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, режим лечения может представлять собой одно введение один раз в неделю, один раз в каждые две недели, один раз в каждые три недели, один раз в каждые четыре недели, один раз в каждый месяц, один раз в каждые три месяца или один раз в каждые три месяца - шесть месяцев.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, предпочтительные расписания дозирования для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела на внутривенное введение. Конкретно, композицию вводят (i) один раз в каждые 4 недели, затем (ii) один раз в каждые 3 месяца.

В конкретных вариантах осуществления, две или более вооруженных НК-клеток, имеющих различные специфичности связывания вводят одновременно, в этом случае, доза каждой вводимой вооруженной НК-клетки лежит в рамках указанных диапазонов. Вооруженную НК-клетку, как правило, вводят несколько раз. Интервал между единичными дозами может представлять собой, например, один раз в неделю, один раз в каждый месяц, в каждые три месяца или один раз в год. Кроме того, интервал может являться нерегулярным. В конкретных вариантах осуществления, дозу корректируют, чтобы получить концентрацию в плазме вооруженной НК-клетки приблизительно 1-1000 мкг/мл, и в конкретных вариантах осуществления, концентрацию в плазме вооруженной НК-клетки приблизительно 25-300 мкг/мл.

Вооруженную НК-клетку можно вводить в форме состава с замедленным высвобождением, в этом случае, необходимо менее частое введение. Дозу и частоту меняют в зависимости от времени полужизни вооруженной НК-клетки у пациента. Вооруженные НК-клетки по изобретению имеют времени полужизни самое большее, приблизительно 3 суток и вплоть до приблизительно 7 суток *in vivo*.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, фармацевтическую композицию используют для профилактического или терапевтического лечения. Дозу и

частоту введения можно менять в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях, вводят относительно низкие дозы в течение длительных периодов времени через относительно нечастые интервалы. Некоторых пациентов продолжают подвергать лечению в течение всей оставшейся жизни. При терапевтических применениях, могут являться необходимыми относительно высокие дозы через относительно короткие интервалы до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, предпочтительно, пока у пациента не проявится частичное или полное облечение симптомов заболевания. После этого, пациента можно лечить в профилактическом режиме.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов фармацевтических композиций по настоящему изобретению не являются токсичными для пациента, чтобы получать желательный терапевтический ответ для индивидуума, в частности, для композиции и способа введения. Их можно изменять для получения эффективного количества активного ингредиента. Выбранный уровень дозы зависит от конкретной используемой композиции, или активности ее эфира, соли или амида, способа введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или веществ, используемых в комбинации с конкретной композицией, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и медицинского анамнеза индивидуума, подлежащего лечению, так же как сходных факторов, хорошо известных в области медицины. Уровень дозирования можно также изменять, в зависимости от нескольких фармакокинетических факторов.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективная доза может предотвращать или задерживать начало патологии. Например, лабораторные тесты, используемые для диагностики заболевания, включают химию, гематологию, серологию и радиологию. Следовательно, клинические или биохимические анализы, мониторирующие один из элементов, упомянутых в настоящем описании выше, можно использовать для определения того, составляет ли конкретное лечение терапевтически эффективную дозу для лечения заболевания. Специалист в данной области может определять такие количества, в зависимости от таких факторов, как рост индивидуума, тяжесть симптомов у индивидуума, и конкретные выбранные композиция или способ введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить, в соответствии с одним или несколькими способами, известными в данной области, посредством одного или нескольких путей введения. Как понятно специалисту в данной области, путь введения и/или способ введения можно изменять, в зависимости от желательного результата.

В соответствии с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, способы введения для вооруженных НК-клеток по настоящему изобретению включают

введение посредством внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, внутрибрюшинного, подкожного, спинального способа или любого другого парентерального способа введения, такого как инъекция или перфузия.

Вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению можно также вводить посредством местного, эпителиального способа введения или способа введения через слизистые оболочки, например, непарентерального способа, такого как интраназальный, пероральный, вагинальный, ректальный, подъязычный или местный.

Активные соединения можно получать с носителями, которые могут защищать соединение против быстрого высвобождения, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, чрескожные пластыри и микроинкапсулированные системы для доставки. Можно использовать биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Множество способов получения этих составов запатентованы или в общем известны специалисту в данной области (см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc, New York, 1978).

Терапевтическую композицию можно вводить посредством медицинских устройств, известных в данной области. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, терапевтические композиции по настоящему изобретению включают устройства, описанные в US 5399163; US 5383851; US 5312335; US 064413; US4941880; US 4790824; или гиподермическое безыгольное устройство для инъекции, такое как устройство, описанное в US 4596556.

Среди примеров имплантатов и модулей, хорошо известных, используемых с вооруженными НК-клетками по настоящему изобретению, можно упомянуть следующие: US 4487603, где описан имплантируемый насос для микроинфузии для введения лекарственных средств с контролируемой скоростью потока; US 4486194, где описано терапевтическое устройство для введения лекарственного средства через кожу; US 4447233, где описан насос для перфузии для введения лекарственного средства с точной скоростью перфузии; US 4447224, где описано имплантируемое устройство для перфузии с переменной скоростью потока для непрерывного введения лекарственного средства; US 4439196, где описана осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерный отсек; и US 4475196, где описаны осмотические системы доставки лекарственного средства. Содержание этих патентных документов приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Множество других имплантатов, систем и модулей для доставки этого типа известны специалисту в данной области.

В конкретных случаях, вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению можно формулировать для обеспечения хорошего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высоко гидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы терапевтические соединения по настоящему изобретению проходили через BBB (если это желательно), их можно формулировать,

например, в липосомах. (См., например, в US 4522811, US 5374548 и US 5399331 способы получения липосом). Липосомы могут содержать одно или несколько веществ, которые избирательно транспортируются к специфическим клеткам или органам, и таким образом, могут улучшать направленное введение лекарственных средств (см., например, VV Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685).

Терапевтические способы

Как указано ранее, указанная комбинация НК-клетки, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественника НК-клетки, способных к связыванию с рекомбинантным полипептидом по настоящему изобретению, и указанного рекомбинантного полипептида представляют собой активные ингредиенты, которые можно использовать в качестве лекарственного средства.

В соответствии с одним вариантом осуществления, указанную НК-клетку, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки, и указанный рекомбинантный полипептид можно вводить совместно.

В соответствии с одним вариантом осуществления, указанную НК-клетку, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки, и указанный рекомбинантный полипептид можно вводить последовательно.

В соответствии с одним вариантом осуществления, указанную НК-клетку, аллогенную или аутологичную, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки, и указанный рекомбинантный полипептид можно вводить в составе нековалентного комплекса. Таким образом, в соответствии с одним из основных вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку НК (естественный киллер) или предшественник НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку НК (естественный киллер) или предшественник НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является связанной с указанной НК-клеткой или ее предшественником; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку НК (естественный киллер) или предшественник НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом;

где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc, содержащую модифицированный домен C_H2, и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой или ее предшественником; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку NK (естественный киллер) или предшественник NK-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc, содержащую модифицированный домен C_H2, и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является связанной с указанной NK-клеткой или ее предшественником; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим основным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к NK-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественнику NK-клетки, прикрепленным к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), способный к связыванию с указанными NK-клеткой или ее предшественником, и (ii) лигандсвязывающий домен; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к NK-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или к предшественнику NK-клетки, прикрепленным к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), связанную с указанными NK-клеткой или ее предшественником, и (ii) лигандсвязывающий домен; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к NK-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или к предшественнику NK-клетки, прикрепленным к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), содержащий модифицированный домен C_H2, способный к связыванию с указанными NK-клеткой или ее предшественником, и (ii) лигандсвязывающий домен; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к NK-клетке, аллогенной или аутологичной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или к предшественнику NK-клетки, прикрепленным к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), содержащую модифицированный домен C_H2, связанную с указанными NK-клеткой или ее

предшественником, и (ii) лигандсвязывающий домен; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим основным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему:

- первую часть, включающую НК-клетку или предшественник НК-клетки;
- вторую часть, включающую рекомбинантный полипептид, содержащий (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен; где указанная область Fc является способной к связыванию с указанными НК-клеткой или предшественником НК-клетки; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему:

- первую часть, включающую НК-клетку или предшественник НК-клетки;
- вторую часть, включающую рекомбинантный полипептид, содержащий (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), содержащую модифицированный домен C_H2, и (ii) лигандсвязывающий домен; где указанная область Fc является способной к связыванию с указанными НК-клеткой или предшественником НК-клетки; для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим объектом настоящего изобретения, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, аллогенную или аутологичную НК-клетку или предшественник НК-клетки по настоящему изобретению, или набор по настоящему изобретению специфически используют в терапевтическом способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания и его производных, или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

Индивидуум или пациент, предусматриваемый по настоящему изобретению, может представлять собой млекопитающее. Млекопитающее, предусматриваемое по настоящему изобретению, может быть выбрано, например, из домашних животных (например, быков, овец, кошек, собак и лошадей), конкретно, кошек и собак, приматов, например, человека и нечеловекообразных приматов, кроликов и грызунов, таких как мыши и крысы. В соответствии с одним вариантом осуществления, индивидуум или пациент, предусматриваемый по настоящему изобретению, может представлять собой человека.

НК-клетка, предпочтительно, аллогенная или аутологичная, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки в комбинации с рекомбинантным полипептидом по настоящему изобретению могут являться особенно подходящими для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, конкретно, для ингибирования роста клеток опухолей у нуждающегося в этом индивидуума.

В соответствии с одним вариантом осуществления, клетки злокачественной опухоли или опухоли, ассоциированные с злокачественной опухолью, могут являться частью меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака

ободочной кишки, рака яичника, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, злокачественной опухоли головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака тела матки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака тела матки, карциномы фаллопиевой трубы, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака пищевода, рака тонкой кишки, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронических или острых лейкозов, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидных опухолей у детей, лимфоидной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или уретры, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-лимфоцитарной лимфомы, индуцированных условиями окружающей среды злокачественных опухолей и комбинаций указанных злокачественных опухолей.

НК-клетка, аллогенная или аутологичная, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник НК-клетки, прикрепленные к рекомбинантному полипептиду по настоящему изобретению, могут являться особенно подходящими для применения в способе лечения или предотвращения инфекционного заболевания, конкретно, для ингибирования или разрушения клеток, инфицированных инфекционным патогеном.

В соответствии с одним вариантом осуществления, инфекционное заболевание может представлять собой (а) заболевание, выбранное из гриппа, герпеса, гиардиоза, малярии и лейшманиоза; (b) патогенной инфекции вирусом, выбранным из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита, вируса герпеса, аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, вируса HTLV, вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, вируса полиомиелита, вируса бешенства, вируса JC и вируса арбовирусного энцефалита; (c) патогенной инфекции бактерией, выбранной из *Chlamydia*, бактерий риккетсий, микобактерии, стафилококка, стрептококка, пневмококка, менингококка и гонококка, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Diphtheria*, *Salmonella*, *Bacilli*, бактерий, вызывающих холеру, столбняк, ботулизм, газовую гангрену, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма; (d) патогенной инфекции грибом, выбранным из *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, рода *Mucorales*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*; или (e) патогенной инфекции паразитом, выбранным из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, видов *Acanthamoeba*, *Giardia*

lamblia, видов *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium virax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

Конкретно, вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, гепатита В или гепатита С; вирус герпеса представляет собой VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV или вирус Эпштейна-Барр; грибок *Candida* представляет собой *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* или *Candida tropicalis*; грибок *Aspergillus* представляет собой *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus niger*; и грибок *Mucorales* представляет собой *mucor*, *absidia* или *rhizophus*.

NK-клетка, предпочтительно, аллогенная или аутологичная, относительно нуждающегося в ней индивидуума, или предшественник NK-клетки, прикрепленные к рекомбинантному полипептиду по настоящему изобретению, могут также являться особенно подходящими для применения в способе лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания или его производного, конкретно, первичного или вторичного аутоиммунного и/или воспалительного заболевания, специфического для органов или системного, и ассоциированного или не ассоциированного с патогенными аутоантителами.

В качестве примера, можно упомянуть следующее: отторжение трансплантата органа, реакция трансплантат против хозяина, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, примитивный синдром Шегрена (или синдром Гужеро-Шегрена), аутоиммунные полиневропатии, такие как рассеянный склероз, диабет типа-I, аутоиммунный гепатит, анкилозирующий спондилит, синдром Рейтера, подагрический артрит, глютенчувствительная целиакия, болезнь Крона, тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, аутоиммунный гепатит, базедова болезнь, язвенный колит, васкулит, такой как ассоциированный с ANCA (антителами к цитоплазме нейтрофилов) системный васкулит, аутоиммунные цитопении и другие гематологические осложнения у взрослых и детей, такие как острая или хроническая аутоиммунная тромбоцитопения, аутоиммунные гемолитические анемии, гемолитическая болезнь новорожденных (HDN), болезнь холодовых агглютининов, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и аутоиммунная приобретенная гемофилия, синдром Гудпасчера, экстрамембранозная нефропатия, аутоиммунные состояния жирной кожи, невосприимчивая миастения, смешанные криоглобулинемии, псориаз, ювенильный идиопатический артрит, воспалительный миозит, дерматомиозит и системные аутоиммунные состояния у детей включая антифосфолипидный синдром.

Настоящее изобретение относится также к способу лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания и его производного или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму вооруженной NK-клетки по настоящему изобретению в комбинации с антигеном или без антигена, специфического для злокачественной опухоли,

аутоиммунного заболевания и его производного или инфекционного заболевания, подлежащего излечению у индивидуума.

Вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению можно также использовать в комбинации с другой терапией, отличной от видов терапии по настоящему изобретению. Например, для лечения злокачественной опухоли, вооруженные НК-клетки по настоящему изобретению можно вводить индивидууму, которого также подвергают лечению против злокачественной опухоли, такому как химиотерапия, радиотерапия, хирургия или генотерапия.

Примеры

Следующие примеры показывают специфичность связывания между eNK-клетками и полипептидом с модифицированной Fc, в частности, полипептидом Fc SDH (Fc-SDHTSFTIE), и их способность к нацеливанию на клетки, вовлеченные в заболевания.

Пример 1: Материал и способы

Получение клеток PBMC

Клетки PBMC (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и моноциты) были получены от здоровых доноров в CHU Montpellier. Клетки отбирали из образцов периферической крови (В-клетки, Т-клетки и моноциты) и из пуповинной крови (НК-клетки) (Sanchez-Martinez et al. 2016, Sanchez-Martinez et al. 2018).

Маркеры клеток PBMC

CD45⁺ является общим маркером для лимфоцитов. CD56⁺ является специфическим маркером для НК-клеток. CD3⁺ является маркером, отличающим Т-лимфоциты. CD16⁺ является специфическим маркером для НК-клеток, обеспечивающих антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

Выделение и активация НК-клеток

Сначала, лимфоциты получали от здоровых доноров в CHU Montpellier. PBMC и UCB (UCBMC), соответственно, отбирали из образцов периферической крови и доз UCB с использованием Histopaque-1077 (Sigma). По существу, 13 мл Histopaque добавляли в 50 мл пробирки для центрифугирования, и 30 мл крови, разведенной 1/2 в RPMI (Invitrogen) медленно добавляли сверху. Пробирки центрифугировали при 1600 оборотов/минуту в течение 30 минут при 20°C без быстрого торможения.

После центрифугирования, мононуклеарные клетки отбирали из белого кольца промежуточного слоя, промывали в RPMI и суспендировали в среде RPMI, дополненной 10% FBS (Invitrogen). Затем лимфоциты замораживали с использованием жидкого азота. Затем замороженные лимфоциты истощали по Т-клеткам с использованием набора для положительного отбора CD3 EasySep™ (STEMCELL technologies). Клетки культивировали в течение 10-20 суток с γ-облученными PLH клетками при соотношении НК-клеток/облученных клеток PLH 1:1, в присутствии IL-2 (100 ед./мл) и IL-15 (5 нг/мл), или только с IL-2 (1000 ед./мл). Клетки PLH добавляли каждые четверо суток, и свежие цитокины каждые двое суток. В конце обработки, чистота НК-клеток (CD56⁺/CD3⁺) всегда составляла более чем 90%.

Антитела IgG1, содержащие модифицированную область Fc

Используемое антитело IgG1 представляет собой трастузумаб (герцептин) или ритуксимаб (ритуксан). Модифицированные области Fc перечислены в следующей таблице.

[Таблица 1]

Обозначение #1	Обозначение #2	IgG	Последовательность EU 231-340
Fc WT (дикого типа)	WT	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 1
Fc SDH	L	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 2
Fc SD	A	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 3
Fc IE	B	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 4
Fc SDIE	C	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 5
Fc SDSTIE	K	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 6
Fc SDHFIE	J	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 7
Fc AL	D	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 8
Fc ALIE	E	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 9
Fc GASD	F	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 10
Fc GASDALIE	G	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 11
Fc GASDIE	H	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 12
Fc SDALIE	I	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 13
Fc LALA	M	IgG1-C _H 2	SEQ ID NO. 14
Fc WT (полноразмерная) с аллотипом nG1m1		IgG1-Fc	SEQ ID NO. 15
Fc WT (полноразмерная) с аллотипом G1m17,1		IgG1-Fc	SEQ ID NO. 16
Fc WT (полноразмерная, обработанная папаином) с аллотипом G1m17,1		IgG1-Fc	SEQ ID NO. 17

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO. 17 включена в аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16. Различие указанных двух аминокислотных последовательностей состоит в том, что первые 10 аминокислот из аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 16 удалены из аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 17.

Мечение полипептидов Fc и антител Fc флуоресцентными молекулами

Для мечення полипептидов Fc и антител Fc, и исследования их связывания с NK-клетками, полипептиды и антитела связывают с флуоресцентной молекулой. Используемые флуоресцентные молекулы представляют собой AlexaFluors 647 (A647) и AlexaFluors 488 (A488), изотиоцианат флуоресцеина (FITC).

Анализ проточной цитометрии

Для анализа фенотипа, клетки окрашивали с использованием 7AAD (Beckman), для идентификации жизнеспособных клеток, и антител против поверхностных маркеров CD25-FITC, CD45RO-FITC, CD69-PE, CD62L-PE, CD19-PE, CD3-PE, CD19-ECD, CD56-PECy7, CD56-APC, CD3-APC, CD45-APCAlexaFluor750, CD45RA-APCAlexaFluor750, CD16-Pacific синий, CD57-Pacific синий, CD45-Krome оранжевый, CD16-Krome оранжевый (Beckman), CD158b-FITC, CD158a-PE, CD107a-HV500 (BD Biosciences),

CD158e-Vioblue (Miltenyi). 1×10^5 - 3×10^5 клеток инкубировали в течение 20-30 минут при 4°C с различными антителами в PBS, содержащем 2,5% FBS. Затем клетки промывали и помещали в суспензию в 200-250 мкл такой же среды. Окрашивание анализировали посредством проточного цитометра Gallios (Beckman), посредством программного обеспечения Kaluza. Живые лимфоциты подвергали окрашиванию FSC/SSC и 7AAD. В-лимфоциты (CD19⁺), Т-лимфоциты (CD3⁺/CD56⁻) и NK-клетки (CD56⁺/CD3⁻) различали с использованием антител против CD19, CD3 и CD56, соответственно.

Тест МТТ

NK-клетки, свежесобранные или замороженные (сохраняемые в жидком азоте) метили с использованием 3 мкМ красителя CellTracker™ фиолетового BMQC (Life Technologies) и инкубировали в течение ночи с клетками-мишенями BT20 при различных соотношениях Е:Т. Затем, транслокацию фосфатидилсерина (PS) и разрушение мембраны анализировали в популяции клеток-мишеней, отрицательных по фиолетовой флуоресценции, посредством проточной цитометрии с использованием аннексина V-FITC (Immunostep) и 7AAD (BD Biosciences) или йодида пропидия (PI). Все клетки, положительные по аннексину-V и/или PI (или 7- AAD), рассматривали как мертвые (или умирающие).

В экспериментах ADCC, клетки-мишени BT20 инкубировали с антителом трастузумабом при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 37°C. Когда NK-клетки вооружают антителами, клетки инкубируют при такой же концентрации антитела до их промывки и инкубации с клетками-мишенями BT20. Использовали ЭГТА (этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту) при 1 мМ для блокирования пути гранулярного экзоцитоза, и MgCl₂ при 1,5 мМ для поддержания осмотического давления. Краситель тетразолий МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) использовали для определения жизнеспособности клеток. Затем 10 мкл МТТ (5 мг/мл) добавляли к адгерентным клеткам (100 мкл среды после 2 промывок с использованием PBS), и затем клетки инкубировали в течение 1 час при 37°C. Через 1 час, 100 мкл 0,05 М HCl добавляли к изопропанолу для растворения кристаллов и количественной оценки окраски при 550 нм в спектрофотометре. Во всех экспериментах, рассчитывали фоновую смерть клеток в отсутствие и в присутствии моноклональных антител. Эти значения вычитали из значений, полученных после обработки NK-клетками или NK-клетками, вооруженными антителами, для получения специфической ADCC, соответственно.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили с использованием BD FACSCANTO II и анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo.

Пример 2: дизайн исследования

- Комбинация полипептида Fc и eNK-клеток (график 1A)

NK-клетки из пуповинной крови (eNK) *in vitro* инкубировали с полипептидами (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647, (iii) Fc SDH A647 при 10 мкг/мл или без Fc в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и окрашивали, относительно маркеров NK.

Затем вооруженные eNK-клетки идентифицировали посредством поверхностных маркеров CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻, посредством проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) различных полипептидов Fc, меченных с использованием A647 (Fc A647), анализировали и нормализовали по полипептиду Fc WT.

- Комбинация антитела Fc трастузумаба и eNK-клеток (график 1B)

eNK-клетки инкубировали с антителом трастузумабом Fc WT, антителом трастузумабом Fc SDH при 10 мкг/мл или без антитела Fc в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и метили с использованием вторичного антитела против Fc IgG человека, связанного с FITC (антитела против IgG Fc FITC). Затем вооруженные eNK-клетки идентифицировали посредством поверхностных маркеров CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻, посредством проточной цитометрии. MFI различных антител против IgG Fc FITC анализировали и нормализовали по Fc WT.

- Специфичность связывания полипептида Fc и рецептора Fc (CD16) eNK-клеток (график 1C)

eNK-клетки инкубировали с полипептидами (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647, (iii) Fc SDH A647 при 10 мкг/мл или без Fc в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и окрашивали, относительно маркеров NK. Затем вооруженные eNK-клетки идентифицировали посредством поверхностных маркеров CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ и CD16⁺ или CD16⁻, посредством проточной цитометрии.

Частоту Fc⁺ eNK-клеток и MFI (нормализованную по Fc WT) анализировали в CD16⁻ NK- и CD16⁺ NK-клетках.

Пример 3: дизайн исследования

eNK-клетки инкубировали с полипептидами (i) Fc LALA A647, (ii) Fc WT A647, (iii) Fc SDH A647 при 10 мкг/мл или без Fc в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и инкубировали при 37°C в течение 2, 3 или 7 суток. На указанные сутки, связывание полипептида Fc на CD16⁺/CD56⁺/CD45⁺/CD3⁻ eNK-клетках анализировали посредством проточной цитометрии (график 2A). Частоту Fc⁺ eNK-клеток и MFI (нормализованную по Fc WT) Fc A647 (график 2B) измеряли на eNK-клетках.

Пример 4: дизайн исследования

- Доза Fc SDH для эффективного прикрепления (график 3A и график 3B)

Для тестирования того, можно ли насыщать все рецепторы CD16A (или FcγRIIIa) посредством полипептида Fc SDH, eNK-клетки инкубировали с увеличивающимися концентрациями полипептида Fc WT или полипептида Fc SDH.

Конкретно, eNK-клетки инкубировали с полипептидами (i) Fc WT A647, (ii) Fc SDH A647 или (iii) Fc SDH A488 при 1, 10, 20, 30, 40 мкг/мл, или без Fc в течение 1 час при 37°C. eNK-клетки, после вооружения полипептидами Fc, промывали и окрашивали, относительно маркеров NK. Вооруженные eNK-клетки идентифицировали как CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ посредством проточной цитометрии. Анализировали MFI Fc A647 (график 3A) или Fc A488 (график 3B).

- Комбинация полипептида Fc SDH и конкурентов (график 3C и график 3D)

Примеры, описанные выше, показывают длительную стабильность полипептида Fc SDH на eNK-клетках, однако, остается вопрос, можно или нет вытеснять это прикрепление посредством другого полипептида Fc при инъекции *in vivo*. Для исследования этого состояния, eNK-клетки инкубировали в условиях насыщения полипептидами Fc SDH A488 (график 3C) или Fc SDH A647 (график 3D) при 20 мкг/мл, или без Fc в течение 1 час при 37°C. eNK-клетки, после вооружения полипептидами Fc, затем промывали, и лиганды-конкуренты рецептора CD16A добавляли в течение 1 час при 37°C: (i) Fc блок; (ii) Fc WT; (iii) Fc SDH; антитело против CD16. Затем eNK-клетки окрашивали, относительно маркеров NK. eNK-клетки определяли как CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ посредством проточной цитометрии. Анализировали MFI Fc A488 (график 3C) или Fc A647 (график 3D).

Пример 5: дизайн исследования

- Выживаемость клеток злокачественных опухолей в присутствии eNK-клеток, вооруженных с использованием антитела Fc SDH (графики 4A, 4B, и 4C)

eNK-клетки инкубировали с антителом трастузумабом Fc WT или с антителом трастузумабом Fc SDH при 10 мкг/мл или 1 мкг/мл, или без антитела в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки, вооруженные антителами Fc, промывали (графики 4B и 4C) или оставляли без промывки (график 4A), инкубировали в течение 1 час (графики 4A и 4B) или в течение 24 час (график 4C) при 37°C, затем помещали в присутствии клеток BT20 в соотношении 1:1 на 24 час при 37°C. Жизнеспособность клеток, представленную посредством процента выживаемости, измеряли посредством теста МТТ.

- Неспецифическая активация посредством вооруженных eNK-клеток (график 4D)

eNK-клетки инкубировали с антителом трастузумабом WT или антителом трастузумабом SDH при 10 мкг/мл или 1 мкг/мл, или без антитела в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки, вооруженные антителами, промывали, инкубировали в течение 1 час при 37°C, затем помещали в присутствии клеток BT20 при соотношении 1:1 с антителами для детекции CD107a при 37°C. После 1 час инкубации, соединения монензин и брефелдин А-типа добавляли на дополнительные 5 час, чтобы блокировать деградацию CD107a. Анализ экспрессии CD107a на CD56⁺/CD45⁺/CD3⁻ eNK-клетках проводили посредством проточной цитометрии.

Пример: 6 дизайн исследования

eNK-клетки инкубировали с антителами Fc WT или Fc SDH при 10 мкг/мл, или без антитела в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и разделяли на 2 образца. Вооруженные eNK-клетки из первого образца метили с использованием антитела против Fc IgG для детекции антител, присутствующих на поверхности мембраны. eNK-клетки из второго образца фиксировали и пермеабелизовали до окрашивания с использованием антитела против Fc IgG, для детекции антител, присутствующих на поверхности мембраны и во внутриклеточной среде. Затем вооруженные eNK-клетки идентифицировали посредством поверхностных маркеров CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻,

посредством проточной цитометрии. Измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) различных антител Fc, меченных посредством антитела против Fc IgG (график 5A).

eNK-клетки инкубировали с полипептидами Fc SDH A488 (график 5B) или Fc SDH A647 (график 5C) при 20 мкг/мл, или без Fc в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали и инкубировали при 37°C в течение 3 суток. Затем, лиганды-конкуренты CD16A добавляли на 1 час при 37°C: (i) Fc блок; (ii) антитело против CD32; (iii) антитело против CD16, клон B73.1, (iv) антитело против CD16. Клетки окрашивали, относительно маркеров NK. eNK-клетки определяли как CD45⁺/CD56⁺/CD3⁻ посредством проточной цитометрии, и анализировали MFI Fc A488 (график 5B) или Fc A647 (график 5C).

Пример 7: дизайн исследования

Предварительно замороженные eNK-клетки инкубировали с полипептидами Fc SDH A647 при 10 мкг/мл в течение 1 час при 37°C. Затем eNK-клетки промывали, и $15 \cdot 10^6$ eNK инъецировали внутривенно взрослой мыши Swiss-nude. Мышь умерщвляли через 24 часа, и перитонеальную жидкость и несколько органов (кровь, костный мозг и селезенку) извлекали для анализа (фигуры 7A, 7B, 7C и 7D). Клетки окрашивали для детекции маркеров NK. С использованием проточной цитометрии, eNK-клетки определяли как CD45⁺/CD56⁺/CD16^{низкий} или CD16⁺, и флуоресценцию Fc A647 анализировали в клетках брюшной полости. Сравнение Fc A647⁺ eNK-клеток среди тотальных CD56⁺ eNK-клеток до и после инъекции *in vivo* (фигура 7B).

Пример 8: дизайн исследования

8.1. Аффинность связывания *in vitro* тестируемых рекомбинантных антител, имеющих модифицированный C_H2 в области Fc, по сравнению с антителом дикого типа, с рецепторами CD16a и CD16b на NK-клетках (фигура 9A).

Свойства связывания тестируемых рекомбинантных антител на CD16a или CD16b сравнивали с антителом дикого типа без мутаций аминокислот в области Fc, в частности, ее последовательности C_H2 (с использованием моноклонального антитела ритуксимаба, аллотипа G1m17,1), посредством SPR (поверхностного плазмонного резонанса) (фигура 9A).

Антитела против полигистидина (R&D Systems) иммобилизовали в устройстве T200 при 25°C в HBS-EP при скорости потока 10 мкл/мин на сенсорном чипе CM5, с использованием активации EDC/NHS, в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Их ковалентно иммобилизовали на уровне 6700RU на проточной ячейке Fc2, и контрольную эталонную поверхность (проточную ячейку Fc1) подготавливали с использованием такой же химической обработки, но без антитела. Все кинетические измерения в Fc1 и Fc2 проводили посредством одного цикла титрования в устройстве T200 при 25°C в HBS-EP при 100 мкл/мин. Каждый рецептор гамма человека (R&D Systems) связывали с иммобилизованным антителом против полигистидина при 20 нМ в течение 60 с. Инъецировали пять увеличивающихся концентраций антитела (время инъекции=120 с). После стадии диссоциации 600 с в рабочем буфере, сенсорную поверхность регенерировали с использованием 5 мкл глицин-HCl pH 1,7. Все

сенсограммы корректировали посредством вычитания низкого сигнала от контрольной эталонной поверхности и инъекций пустого буфера. Кинетические параметры оценивали по сенсограммам с использованием моделей двух состояний из программного обеспечения для оценки T200.

Результаты нормализованы, относительно аффинности антитела WT на рецепторе.

8.2. Кинетика связывания на CD16+ клетках тестируемых рекомбинантных антител от 1 час до 72 час после вооружения CD16 (фигура 9B).

Кинетику нековалентного связывания на клеточной поверхности CD16+ клеток (т.е., NK-клеток) оценивали посредством FACS. eNK инкубировали с ритуксимабом WT или несущими рекомбинантными антителами при 10 мкг/мл в течение 1 час при 37°C. Затем NK-клетки промывали и инкубировали при 37°C в течение 1 час, 24 час, 48 час или 72 час.

Проточную цитометрию использовали для анализа связывания mAb, с использованием антиидиотипического антитела, на CD56+/CD45+/CD16+/CD3- eNK-клетках. Средний % вооруженных NK-клеток указан на графике. Все эксперименты проводили с использованием BD FACSCANTO II и анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo.

Пример 9: дизайн исследования

eNK-клетки инкубировали с рекомбинантным ритуксимабом SDH (RTX- Fc SDH) и/или рекомбинантным трастузумабом SDH (TRAST- Fc SDH) при 10 мкг/мл в течение 1 час при 37°C.

Затем NK-клетки промывали и анализировали посредством проточной цитометрии по связыванию Ab, с использованием антиидиотипического антитела, на CD56+/CD45+/CD16+/CD3- eNK-клетках. Все эксперименты проводили с использованием BD FACSCANTO II и анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo.

Пример 10: дизайн исследования

CD16+ NK-клетки вооружали с использованием рекомбинантного RTX-SDH или без (Fc WT), затем инкубировали с первичными клетками В-лимфомы от пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны (1, 2, 3), пациентов с DLBCL (4, 5), пациентов с фолликулярной лимфомой (6, 7) при соотношении Е:Т 3:1 в течение 16 час.

Проточную цитометрию использовали для определения процента ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности) вооруженных CD16+ NK-клеток после вычитания естественной цитотоксичности NK-клеток (n=2-4 тестируемых доноров eNK, точки). Планки представляют среднее±SEM. Вне зависимости от типа В-лимфомы и пациента, CD16+ клетки, вооруженные RTX-SDH, уничтожают больше клеток-мишеней, чем CD16+ клетки отдельно (на от 20% до 70% больший цитотоксический эффект).

Результаты

Пример 2: Прикрепление полипептида Fc SDH является более эффективным, чем прикрепление Fc дикого типа (WT)

Можно наблюдать слабое прикрепление полипептида Fc LALA к eNK-клеткам (график 1A) и антитела Fc WT к eNK-клеткам (график 1B). С другой стороны, наблюдают сильное прикрепление полипептида Fc SDH к eNK-клеткам, по сравнению с положительным контролем (Fc WT), относительно либо выделенного полипептида (график 1A), либо области Fc антитела IgG (график 1B).

Кроме того, отмечено, что интенсивность флуоресценции полипептида Fc SDH является значимо более высокой в популяции CD16⁺ eNK-клеток (30), относительно популяции CD16⁻ eNK-клеток (3) (график 1C, слева). Также, процент Fc⁺ eNK-клеток является значимо более высоким в популяции CD16⁺ eNK-клеток, вооруженных Fc SDH (100%), относительно популяции CD16⁻ eNK-клеток, вооруженных Fc SDH (40%). Таким образом, прикрепление области полипептида Fc SDH является высоко специфическим для популяции CD16⁺ eNK-клеток (график 1C), что позволяет предполагать, что главным рецептором Fc, используемым Fc WT или Fc SDH, является CD16A.

Специфичность связывания полипептида Fc SDH с eNK-клетками сильно увеличена, относительно прикрепления полипептида Fc WT, в результате мутаций SDH (40% из CD16⁺ eNK-клеток, вооруженных Fc WT, против 100% из CD16⁺ eNK-клеток, вооруженных Fc SDH, график 1C, справа).

eNK-клетки, вооруженные Fc SDH, прикрепленные к флуоресцентным молекулам, иллюстрируют способность этих вооруженных eNK-клеток связываться с любой малой молекулой, например, представляющими интерес антигенами, позволяя узнавание и удаление клеток-мишеней, вовлеченных в заболевания.

Пример 3: Прикрепление полипептида Fc SDH является стабильным с течением времени

Анализ проточной цитометрии показывает, что в eNK-клетках являются практически истощенными полипептиды Fc LALA и Fc WT после 2 суток инкубации, по сравнению с отрицательным контролем (без Fc). В отличие от этого, полипептид SDH остается сильно прикрепленным к eNK-клеткам после 7 суток инкубации (график 2A).

Кроме того, отмечено, что более чем 80% eNK-клеток все еще несут полипептид Fc SDH после 7 суток, в то время как прикрепление полипептида Fc WT является очень слабым к 2^{-м} суткам инкубации, где приблизительно 10% клеток все еще несут полипептид Fc WT (график 2B).

В заключение, прикрепление между Fc SDH - eNK-клетками остается чрезвычайно стабильным, по меньшей мере до 7 суток инкубации.

Пример 4: Комбинация Fc SDH-NK-клетки является насыщающей и не может поддаваться вытеснению в нормальных физиологических условиях

Низкая доза полипептида Fc SDH является необходимой для насыщения рецепторов NK-клеток.

Полипептид Fc SDH A647 быстро насыщает участки CD16A, начиная при 10 мкг/мл, в то время как для полипептида Fc WT A647 не достигают насыщения даже при 40 мкг/мл (график 3A). Подобным образом, полипептид Fc SDH, прикрепленный к

флуоресцентной молекуле, отличной от A488, насыщает eNK-клетки, начиная с 10 мкг/мл (график 3B).

Таким образом, низкая доза полипептида Fc SDH является необходимой для насыщения NK-клеток.

Прикрепление полипептида Fc SDH не может быть удалено в физиологических условиях.

Данные показывают, что две формы полипептида Fc дикого типа (Fc блок и Fc WT A647), не модифицировали уровень прикрепленного полипептида Fc SDH. В отличие от этого, другой полипептид Fc SDH снижал уровень Fc SDH, первоначально прикрепленного к двум комбинациям флуорохромов A488 и A647, из-за такой же аффинности для CD16A. Наибольшее вытеснение наблюдали, когда использовали антитело против CD16, что подразумевает, что прикрепление Fc SDH зависит от рецептора CD16A (графики 3C и 3D).

Таким образом, после прикрепления к CD16A, полипептид Fc SDH не может быть удален посредством полипептидов Fc WT, что позволяет предполагать, что, когда eNK-клетку, вооруженную полипептидом Fc SDH, инъецируют *in vivo*, полипептид Fc SDH остается стабильным и прикрепленным к NK-клетке.

Пример 5: eNK-клетки, вооруженные антителами Fc SDH, являются более цитотоксическими и проявляют высокие уровни дегрануляции

Для eNK-клеток, вооруженных антителами Fc SDH, показана более высокая цитотоксичность, чем для eNK-клеток отдельно или вооруженных антителами Fc WT

Для тестирования цитотоксичности вооруженных eNK-клеток, выбрано использование модифицированного антитела трастузумаба, специфического для белка HER2, экспрессированного на поверхности клеток злокачественных опухолей, включая линию клеток рака молочной железы BT20. Эти линии клеток могут являться мишенью для вооруженных eNK. Результаты показывают, что eNK-клетки, вооруженные антителом Fc SDH при 10 мкг/мл, являются более цитотоксическими, чем eNK-клетки отдельно или вооруженные антителами Fc WT при 10 мкг/мл (графики 4A и 4B). Такие же результаты получены для eNK-клеток, вооруженных в течение 24 час антителами Fc SDH (график 4C). Для дозы антител при 1 мкг/мл показан менее сильный эффект. Антитело Fc WT, по-видимому, не оказывает никакого эффекта, относительно eNK-клетки отдельно (без антитела). Таким образом, уровень цитотоксичности eNK-клеток улучшают с использованием антител Fc SDH.

Высокий уровень дегрануляции eNK-клеток, вооруженных антителами Fc SDH

Цитотоксичность eNK-клеток опосредована посредством дегрануляции. Этот механизм можно измерять посредством экспрессии CD107a. Мембранная экспрессия CD107a является маркером для цитотоксической активности NK-клеток. Таким образом, экспрессию CD107a анализировали посредством проточной цитометрии на eNK-клетках, вооруженных антителом Fc WT или антителом Fc SDH, в присутствии или в отсутствие клеток-мишеней (клеток BT20). Результаты показывают, что CD107a не индуцирован на

вооруженных eNK-клетках без клеток-мишеней (график 4C, вверху), что позволяет предполагать, что прикрепление антител к CD16A не подразумевает активацию вооруженных eNK-клеток в отсутствие клеток-мишеней. Во-вторых, для eNK-клеток, вооруженных антителом Fc SDH при 10 мкг/мл, показана более высокая экспрессия CD107a, чем для антитела Fc WT или в отсутствие антител (график 4D, внизу).

Одним из механизмов, используемых eNK-клетками, вооруженными антителом Fc, является дегрануляция, и этот механизм является более эффективным на eNK-клетках, вооруженных антителом Fc SDH.

Пример 6: Антитело Fc SDH, прикрепленное к рецептору Fc (CD16) eNK-клеток, не подвергается интернализации

Отмечено, что, после 3 суток инкубации, антитело Fc SDH A647 или антитело Fc SDH A488 удаляется посредством конкурирующего антитела против CD16. С другой стороны, антитело против CD32 не вытесняет антитело Fc SDH, первоначально прикрепленное к рецептору Fc. Таким образом, отмечено, что антитело Fc SDH остается присутствующим на поверхности eNK-клеток и таким образом, не подвергается интернализации (фигура 5).

Кроме того, в нескольких исследованиях опубликована экскреция или интернализация рецепторов CD16 в ходе активации NK-клеток (Romee et al., 2013; Саруано et al., 2017). Для измерения того, нарушает ли прикрепление к области Fc экспрессию рецептора CD16A, использовали антитело против CD16, клона B73.1, на присоединение которого, предположительно, не влияет маскировка Fc, поскольку его эпитоп находится в первом удаленном от мембраны домене Ig-типа молекулы CD16 (Grier et al., 2012). Однако, можно наблюдать на графиках 3C и 3D, что это антитело может вытеснять антитело Fc SDH. Таким образом, результаты на фигуре 5 показывают, что частота CD16⁺ eNK-клеток не изменяется с течением времени и в соответствии с состояниями Fc.

Пример 7: Прикрепление области Fc SDH на eNK-клетках является стабильным *in vivo*

Для обеспечения стабильности связывания Fc SDH - eNK-клетки в условиях *in vivo*, eNK-клетки, вооруженные полипептидами Fc SDH, инъецировали внутривенно взрослой мыши Swiss-nude. Отмечено, что многие eNK-клетки (15% из всех клеток) обнаружены в брюшной полости (фигура 7A). Эти клетки все еще являлись по большей части CD16⁺ (79%), и большинство из CD16⁺ eNK-клеток являлись вооруженными полипептидами Fc SDH A647 (87%). До инъекции, предоставлено 84% из тотальных eNK-клеток с полипептидами Fc SDH A647, и 73% из них оставались положительными через 24 час *in vivo* (фигура 7B). Кроме того, через 24 час после инъекции, отмечено, что небольшое количество eNK-клеток присутствуют в крови или костном мозге (фигура 7C). Однако, некоторые CD16⁺ eNK-клетки мигрировали к селезенке и оставались вооруженными Fc SDH A647 (88%) в селезенке (фигура 7D).

Таким образом, эти результаты показывают, что прикрепление Fc SDH остается стабильным на eNK-клетках после инъекции *in vivo*.

Пример 8:

8.1. Аффинность связывания *in vitro* различных мутантов C_H2, по сравнению с формой дикого типа, с CD16A и CD16B (фигура 9A).

Фигура 9A представляет аффинность тестированных рекомбинантных антител против CD16a (светло-серый) и CD16b (темно-серый), по сравнению с эталонным значением для антитела RTX- Fc WT. Данные показывают, что, за исключением рекомбинантного антитела D (Fc AL - SEQ ID NO. 8), для всех других рекомбинантных антител показано улучшенное связывание *in vitro* с рецепторами CD16a и CD16b (фигура 9A).

Среди всех тестированных рекомбинантных антител, для С (Fc SDIE - SEQ ID NO. 5), I (Fc SDALIE - SEQ ID NO. 13), J (Fc SDHFIE - SEQ ID NO. 7), K (Fc SDSTIE - SEQ ID NO. 6) и L (Fc SDH - SEQ ID NO. 2) показано наивысшее связывание с CD16a с близким к 8-кратному или более увеличением аффинности, по сравнению с антителом WT. Для рекомбинантных антител E (Fc ALIE - SEQ ID NO. 9), G (Fc GASDALIE - SEQ ID NO. 11) и H (Fc GASDIE - SEQ ID NO. 12) показано в 5-6 раз увеличенное связывание, и для рекомбинантных антител A (Fc SD - SEQ ID NO. 3), B (Fc IE - SEQ ID NO. 4) и F показано меньшее улучшение с 2-3-кратным увеличением связывания с CD16a.

Конкретно, рекомбинантные антитела J, K и L разделяют одинаковые мутации S239D и I332E, и для одной или двух дополнительных мутаций показана заметная аффинность связывания, по сравнению со всеми другими рекомбинантными антителами, включая другие рекомбинантные антитела С, G, H или I, разделяющие одинаковые мутации S239D и I332E. Эти дополнительные мутации в рекомбинантных антителах J, K и L могут, таким образом обеспечивать преимущество, при приведении этих антител в контакт с CD16+ клетками и/или NK-клетками.

Рекомбинантное антитело L (Fc SDH - SEQ ID NO. 2) включает мутации S239D, H268F, S324T и I332E. Мутация H268F включена в рекомбинантное антитело J, в то время как мутация S324T включена в рекомбинантное антитело K. Таким образом, мутации H268F и S324T также обеспечивают увеличение аффинности связывания антитела на рецепторе CD16a.

Результаты для CD16b являются относительно сходными, за исключением того, что наблюдают улучшенное связывание CD16b с мутантами С и L, в меньшей степени.

8.2. Кинетика связывания на CD16+ клетках тестированных рекомбинантных антител, имеющих модифицированный C_H2 в области Fc, от 1 час до 72 час после вооружения CD16 (фигура 9B).

Фигура 9B представляет процент CD56⁺/CD45⁺/CD16⁺/CD3⁻ eNK-клеток, с покрытой RTX-Fc WT или каждым рекомбинантным антителом (RTX) поверхностью, через 1 час, 24 час, 48 час или 72 час после вооружения.

Менее чем 20% из CD16+ клеток являлись покрытыми через 1 час RTX-FcWT и рекомбинантным антителом D, и с 24 часов большинство из NK-клеток (CD16+ клеток) не представляли антитело на своей поверхности (фигура 9B).

Все другие рекомбинантные антитела являются способными к связыванию на более чем 50% CD16+ клеток (т.е., NK-клеток) через 1 час, но наблюдают несовпадения, применительно к их кинетике связывания. Связывание рекомбинантных антител A, B, E и F очень сильно уменьшается через 24 часа с потерей более чем 50%, по сравнению с 1 час. Это не так для рекомбинантных антител C, G, H, I, J, K и L, для которых наблюдают стабильное связывание с течением времени и до 72 часов, где более чем 50% CD16+ клеток остаются покрытыми антителами, по сравнению с 1 час. Можно предполагать, что рекомбинантные антитела с наилучшей аффинностью для CD16 могут являться наилучшим образом вооружающими CD16+ клетки, и наоборот. Однако, в то время как для него представлена более высокая аффинность для CD16, чем у мутанта H и мутанта G, для мутанта E представлено менее стабильное связывание на CD16+ клетках.

Следует отметить, что рекомбинантные антитела I, J и K, разделяющие одинаковые мутации S239D и I332E с одной дополнительной мутацией, имеют длительную и стабильную персистенцию связывания с рецептором CD16 между рекомбинантным антителом и NK-клеткой (CD16+ клеткой).

Важно также отметить, что аллотип не оказывает влияния на длительное стабильное связывание рекомбинантных антител, как показано посредством сравнения RTX-L-R (аллотип G1m17,1) и RTX-L-T (аллотип nG1m1) на фигуре 9B.

Эти данные показывают, что неожиданное длительное связывание (более чем 72 часов, фигура 9B) различных рекомбинантных антител на CD16+ клетках невозможно предполагать по улучшению их аффинности для рецептора (фигура 9A).

Пример 9: Эффективность множественного вооружения на CD16+ клетках

Результаты, изображенные на фигуре 10, показывают, что CD16+ клетки (т.е., NK-клетки) можно вооружать совместно двумя mAb, где каждое подвергнуто мутации в домене CH2. Это двойное вооружение имеет такую же эффективность связывания, как одиночное вооружение.

Пример 10: Увеличение цитотоксичности CD16+ клеток, вооруженных рекомбинантным ритуксимабом Fc SDH

Результаты, изображенные на фигуре 11, показывают, что вооружение ex vivo CD16+ клеток (т.е., NK-клеток) моноклональным антителом, содержащим мутацию Fc SDH (представленную в SEQ ID NO. 2), может приводить к сильной ADCC для подвергаемых нацеливанию клеток злокачественных опухолей.

Список процитированных документов

Capuano, C., C. Pighi, R. Molfetta, R. Paolini, S. Battella, G. Palmieri, G. Giannini, F. Belardinilli, A. Santoni & R. Galandrini (2017) Obinutuzumab-mediated high-affinity ligation of FcγRIIIA/CD16 primes NK cells for IFNγ production. *Oncoimmunology*, 6, e1290037.

Grier, J. T., L. R. Forbes, L. Monaco-Shawver, J. Oshinsky, T. P. Atkinson, C. Moody, R. Pandey, K. S. Campbell & J. S. Orange (2012) Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest*, 122, 3769-80.

Moore, G. L., H. Chen, S. Karki & G. A. Lazar (2010) Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*, 2, 181-9.

Romee, R., B. Foley, T. Lenvik, Y. Wang, B. Zhang, D. Ankarlo, X. Luo, S. Cooley, M. Verneris, B. Walcheck & J. Miller (2013) NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, 121, 3599-608.

Sanchez-Martinez, D., N. Allende-Vega, S. Orecchioni, G. Talarico, A. Cornillon, D. N. Vo, C. Rene, Z. Y. Lu, E. Krzywinska, A. Anel, E. M. Galvez, J. Pardo, B. Robert, P. Martineau, Y. Hicheri, F. Bertolini, G. Cartron & M. Villalba (2018) Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics*, 8, 3856-3869.

Список последовательностей

SEQ ID NO. 1 (= область Fc WT (IgG1-C_H2))

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO. 2 (= область Fc SDH (IgG1-C_H2.S239D.H268F.S324T.I332E))

APELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**S**FEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV**T**NKALPA**P**EEKTISKAK

SEQ ID NO. 3 (= область Fc SDH (IgG1-C_H2.S239D))

APELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO. 4 (= область Fc IE (IgG1-C_H2.I332E))

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**P**EEKTISKAK

SEQ ID NO. 5 (= область Fc SDIE (IgG1-C_H2.S239D.I332E))

APELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**P**EEKTISKAK

SEQ ID NO. 6 (= область Fc SDSTIE (IgG1-C_H2.S239D.S324T.I332E))

APELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV**T**NKALPA**P**EEKTISKAK

SEQ ID NO. 7 (= область Fc SDHFIE (IgG1-C_H2.S239D.H268F.I332E))

APELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**S**FEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**P**EEKTISKAK

SEQ ID NO. 8 (= область Fc AL (IgG1-C_H2.A330L))

APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**P**LPIEKTISKAK

SEQ ID NO. 9 (= область Fc ALIE (IgG1-C_H2.A330L.I332E))

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAK
SEQ ID NO. 10 (= область Fc GASD (IgG1-C_H2.G236A.S239D))

APELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
SEQ ID NO. 11 (= область Fc GASDALIE (IgG1-C_H2.G236A.S239D.A330L.I332E))

APELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAK
SEQ ID NO. 12 (= область Fc GASDIE (IgG1-C_H2.G236A.S239D.I332E))

APELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAK
SEQ ID NO. 13 (= область Fc SDALIE (IgG1-C_H2.S239D.A330L.I332E))

APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAK
SEQ ID NO. 14 (= область Fc LALA (IgG1-C_H2. L234A.L235A))

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
SEQ ID NO. 15 (= область Fc WT (IgG1) аллотипа nG1m1)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO. 16 (= область Fc WT (IgG1) аллотипа G1m17,1)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO. 17 (= область Fc WT (IgG1) аллотипа G1m17,1, включенная в SEQ ID NO. 16)

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая CD16+ клетку в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным к связыванию с поверхностным белком FcγRIII (CD16), где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с поверхностным белком FcγRIII (CD16), экспрессированным CD16+ клеткой, и где указанный рекомбинантный полипептид содержит:

(i) модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, связанный, необязательно, посредством линкера, с

(ii) лигандсвязывающим доменом,

где лигандсвязывающий домен содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью;

где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный C_H2 домен IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO 1, или последовательностью с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU.

2. Композиция по п.1, где модифицированный домен C_H2 является модифицированным, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, представленного SEQ ID NO 1.

3. Композиция по п.1, где поверхностный белок FcγRIII (CD16) представляет собой поверхностный белок FcγRIIIa/CD16a.

4. Композиция по п.2, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T, G236A и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

5. Композиция по п.2, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

6. Композиция по п.2, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F и S324T, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

7. Композиция по п.6, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

8. Композиция по п.6, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и H268F, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

9. Композиция по п.5, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и A330L, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

10. Композиция по п.6, где модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E, H268F и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

11. Композиция по п.2 или 3, где модификация домена C_{H2} , относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа, состоит из мутаций S239D и I332E.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, где CD16+ клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, где рекомбинантный полипептид представляет собой антитело, и модификация в домене C_{H2} является симметричной или асимметричной, относительно пары доменов C_{H2} (или пары тяжелых цепей), составляющих антитело.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, где рекомбинантный полипептид содержит область Fc (кристаллизующийся фрагмент) IgG1 человека, содержащую модифицированный C_{H2} .

15. Композиция по любому из пп.1-14, где рекомбинантный полипептид представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие модифицированный домен C_{H2} , как определено в любом из пп. 1-6, или область Fc, как определено в п. 14, и лигандсвязывающий домен, выбранный из лигандсвязывающего домена любого из следующих антител: абагоумаб, абатацепт, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумаб, адуканумаб, афлиберцепт, афутузумаб, алацизумаб, алефацепт, алемтузумаб, алирокумаб, альтумомаб, аматуксимаб, анатумомаб, анетумаб, анифромумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белатацепт, белиумаб, бенрализумаб, бертилиумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб, блинатумомаб, блосозумаб, бокоцизумаб, брентуксимаб, бриакимумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, брнтицизумаб, канакинумаб, кантузумаб, каплацизумаб, капромаб, карлумаб, катумаксумаб, цеделизумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, цитатузумаб, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб, кодритузумаб, колтуксимаб, конатумумаб, концизумаб, кренезумаб, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб, деносумаб, дерлотуксимаб, детумомаб, динутуксимаб, диридавумаб, дорлимомаб, дрозитумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб, энлимомаб, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этанерцепт, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фазимумаб, фелвизумаб, фезкимумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фрезолимумаб,

фулрамумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембату́мумаб, голимумаб, гомиликсимаб, гуселкумаб, ибализумаб, ибриту́момаб, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб, индусату́маб, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, ламбролизумаб, лампализумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лензилумаб, лерделиму́маб, лексату́мумаб, либивирумаб, лифастузумаб, лигелизумаб, лилотомаб, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб, лукату́мумаб, лулизумаб, лумиликсимаб, лумрету́зумаб, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, маврилиму́маб, матузумаб, меполизумаб, метелиму́маб, милатузумаб, минрету́момаб, мирветуксимаб, митумомаб, могамулизумаб, моролиму́маб, мотавизумаб, моксету́момаб, муромонаб-CD3, наколомаб, намилумаб, наптумомаб, нарнату́маб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофету́момаб, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офату́мумаб, оларату́маб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, онтуксизумаб, опицину́маб, опортузумаб, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлертузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пазотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб, пинтумомаб, полатузумаб, понезумаб, приликсимаб, притумумаб, квилизумаб, ракотумомаб, радрету́маб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилонце́пт, рилотумумаб, ринкукумаб, ритуксимаб, робату́мумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб, самализумаб, сарилумаб, сату́момаб, секукимумаб, серибанту́маб, сетоксаксимаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалиму́маб, силтуксимаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стаму́лумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплиту́момаб, тарексту́маб, тефибазумаб, телимомаб, аритокс, тенату́момаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тесидолумаб, TGN 1412, тицлиму́маб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксу́маб, тозитумомаб, товетумаб, тралокиму́маб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тремелиму́маб, тревогрумаб, тукотузумаб, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплу́маб, урелумаб, уртоксазумаб, устекиму́маб, вандортузумаб, вантукту́маб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлиму́маб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, занолиму́маб, затуксимаб, зиралиму́маб, зив-афлиберце́пт и золимомаб.

16. Композиция по любому из пп.1-15, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в способе лечения или предотвращения

злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп.1-16, необязательно, дополнительно содержащая наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

18. Композиция по любому из пп.1-16 или фармацевтическая композиция по п.17, где CD16+ клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

19. Композиция, содержащая клетку NK (естественный киллер) в комбинации с рекомбинантным полипептидом, способным к связыванию с поверхностным белком FcγRIII (CD16), где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с поверхностным белком FcγRIII (CD16), экспрессированным клеткой NK (естественным киллером), и где указанный рекомбинантный полипептид содержит:

(i) модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, связанный, необязательно, посредством линкера, с

(ii) лигандсвязывающим доменом,

где лигандсвязывающий домен содержит последовательность, способную к связыванию с лигандом-мишенью;

где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO. 1, или последовательностью с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU,

20. Композиция по п.19, где модифицированный домен C_H2 является модифицированным, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, представленного SEQ ID NO 1.

21. Композиция по п.20, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T, G236A и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

22. Композиция по п.20, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

23. Композиция по п.20, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F и S324T, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

24. Композиция по п.23, где модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

25. Композиция по п.23, где модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и H268F, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

26. Композиция по п.22, где модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E и A330L, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

27. Композиция по п.23, где модифицированный домен C_{H2} содержит аминокислотные замены S239D, I332E, H268F и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа.

28. Композиция по п.20, где модификация домена C_{H2} , относительно домена C_{H2} IgG1 человека дикого типа, состоит из мутаций S239D и I332E.

29. Композиция по любому из пп. 19-28, где CD16 клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума.

30. Композиция по любому из пп. 19-29, где рекомбинантный полипептид представляет собой антитело, и модификация в домене C_{H2} является симметричной или асимметричной, относительно пары доменов C_{H2} (или пары тяжелых цепей), составляющих антитело.

31. Композиция по любому из пп. 19-30, где рекомбинантный полипептид содержит область Fc (кристаллизующийся фрагмент) IgG1 человека, содержащую модифицированный домен C_{H2} .

32. Композиция по любому из пп.19-31, где рекомбинантный полипептид представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие домен C_{H2} , как определено в любом из пп. 19-31, и лигандсвязывающий домен, выбранный из лигандсвязывающего домена любого из следующих антител: абаговомаб, абатацепт, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекватумаб, адуканумаб, афлиберцепт, афутузумаб, алацизумаб, алефацепт, алемтузумаб, алирокумаб, альтумомаб, аматуксимаб, анатумомаб, анетумаб, анифромумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белатацепт, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб, блинатумомаб, блосозумаб, бокоцизумаб, брентуксимаб, бриакимумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтицизумаб, канакинумаб, кантузумаб, каплацизумаб, капромаб, карлумаб, катумаксумаб, цеделизумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, цитатузумаб, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб, кодритузумаб, колтуксимаб, конатумумаб, концизумаб, кренезумаб, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб, деносумаб, дерлотуксимаб, детумомаб, динутуксимаб,

диридавумаб, дорлимомаб, дрозитумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб, энлимомаб, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этанерцепт, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фазимумаб, фелвизумаб, фезкимумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фрезолимумаб, фулрамумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб, голимумаб, гомиликсимаб, гуселкумаб, ибализумаб, ибритумомаб, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб, индусатумаб, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, ламбролизумаб, лампализумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб, лигелизумаб, лилотомаб, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, лулизумаб, лумиликсимаб, лумретузумаб, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб, митумомаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб, муромонаб-CD3, наколомаб, намилумаб, наптумомаб, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлартузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пазотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб, пинтумомаб, полатузумаб, понезумаб, приликсимаб, притумумаб, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилонцепт, рилотумумаб, ринкукумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб, секукимумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб, тарекстумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тесидолумаб, TGN 1412, тицлимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокимумаб, трастузумаб,

TRBS07, трегализумаб, тремелиумаб, тревогрумаб, тукотузумаб, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекиумаб, вандортузумаб, ванктикумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлиумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, занолиумаб, затуксимаб, зиралиумаб, зив-афлиберцепт и золимомаб.

33. Композиция по любому из пп.19-32, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп.19-32, необязательно, дополнительно содержащая наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

35. Композиция по любому из пп.19-32 или фармацевтическая композиция по п.34, где CD16 клетка является аллогенной, относительно нуждающегося в ней индивидуума, для применения в качестве лекарственного средства; предпочтительно, для применения в способе лечения или предотвращения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом индивидуума.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку NK (естественный киллер), в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной NK-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, где модифицированный домен C_H2 характеризуется содержанием мутаций S239D и I332E, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, и где указанный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа представлен SEQ ID NO 1, или последовательностью с процентом идентичности по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1, и содержит положения последовательности 231-340, в соответствии с нумерацией EU,

37. Фармацевтическая композиция по п.36, где модифицированный домен C_H2 является модифицированным, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, представленного SEQ ID NO 1.

38. Фармацевтическая композиция по п.36, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T, G236A и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

39. Фармацевтическая композиция по п.36, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F, S324T и A330L, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

40. Фармацевтическая композиция по п.36, где модифицированный домен C_H2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из списка, состоящего из H268F и S324T, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

41. Фармацевтическая композиция по п.40, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

42. Фармацевтическая композиция по п.40, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и H268F, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

43. Фармацевтическая композиция по п.39, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E и A330L, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

44. Фармацевтическая композиция по п.40, где модифицированный домен C_H2 содержит аминокислотные замены S239D, I332E, H268F и S324T, в соответствии с нумерацией EU, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа.

45. Фармацевтическая композиция по п.37, где модификация домена C_H2, относительно домена C_H2 IgG1 человека дикого типа, состоит из мутаций S239D и I332E.

46. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-45, дополнительно содержащая наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

47. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-46; для применения в качестве лекарственного средства.

48. НК-клетка, аллогенная, относительно нуждающегося в ней индивидуума, прикрепленная к рекомбинантному полипептиду, где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), и (ii) связывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, как определено в любом из пп. 36-45; для применения в качестве лекарственного средства.

49. Набор, содержащий:

- первую часть, содержащую CD16+ клетку, предпочтительно, CD16+ клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и
- вторую часть, содержащую рекомбинантный полипептид, как определено в любом из пп. 1-15; для применения в качестве лекарственного средства.

50. Набор, содержащий:

- первую часть, содержащую НК-клетку, предпочтительно, НК-клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и
- вторую часть, содержащую рекомбинантный полипептид, как определено в любом из пп. 19-32; для применения в качестве лекарственного средства.

51. Набор, содержащий:

- первую часть, включающую НК-клетку, предпочтительно, НК-клетку, аллогенную, относительно нуждающегося в ней индивидуума; и

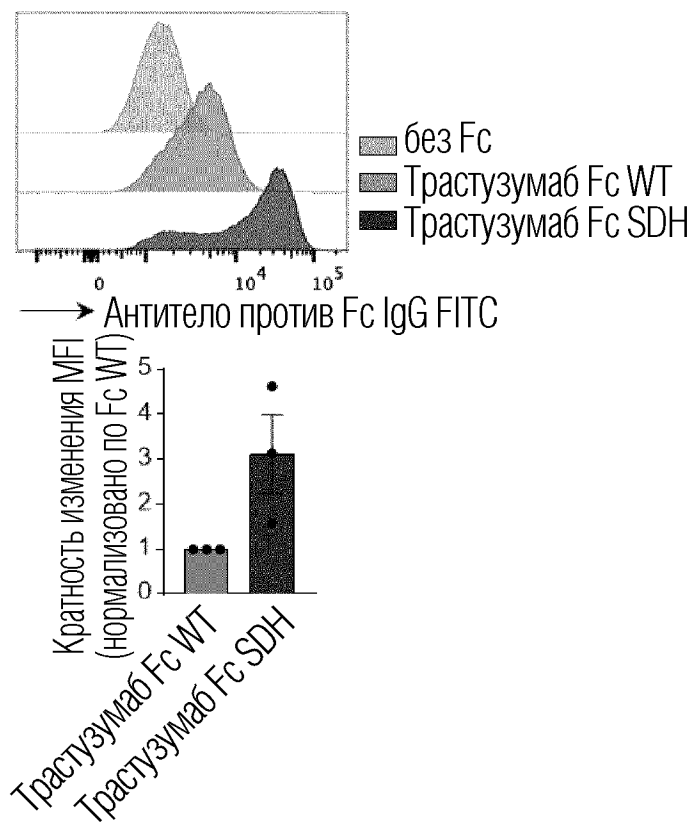
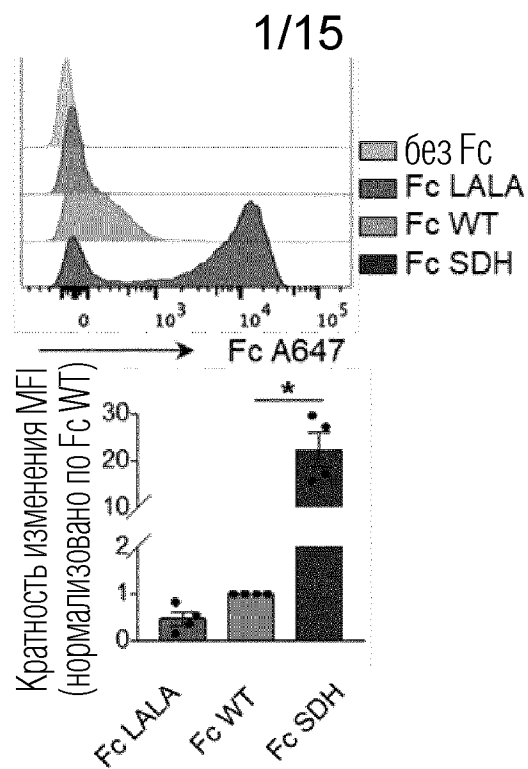
- вторую часть, включающую рекомбинантный полипептид, содержащий (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент), и (ii) лигандсвязывающий домен; где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой и содержащей по меньшей мере один модифицированный домен C_H2 IgG1 человека дикого типа, как определено в любом из пп. 36-45; для применения в качестве лекарственного средства.

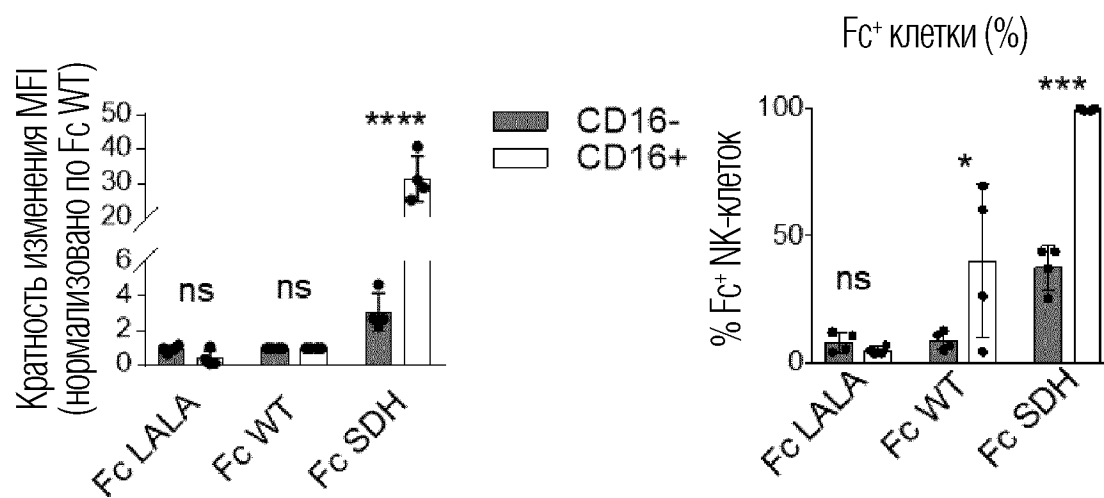
52. Фармацевтическая композиция, содержащая CD16+ клетку, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) в аминокислотной последовательности области Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной CD16+ клеткой, и дополнительно содержащая наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

53. Фармацевтическая композиция по п.52, где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с CD16+ клеткой.

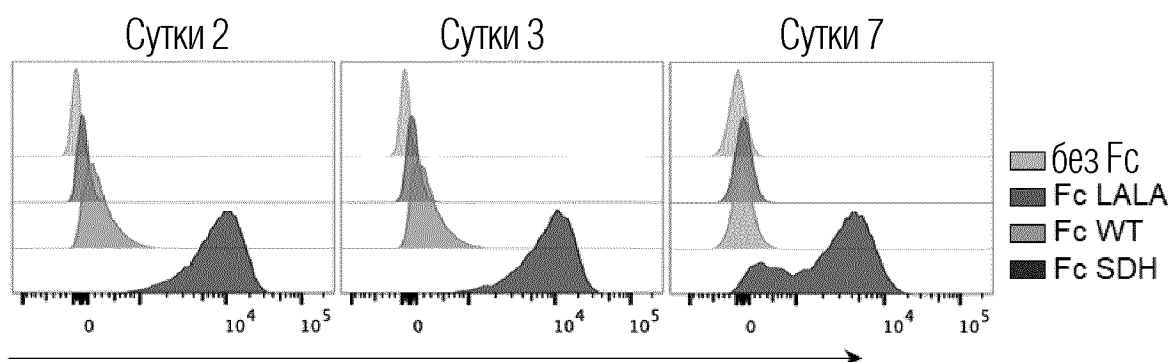
54. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку НК (естественный киллер) или предшественник НК-клетки, в комбинации с рекомбинантным полипептидом; где указанный рекомбинантный полипептид содержит (i) модифицированную область Fc (кристаллизующийся фрагмент) в аминокислотной последовательности области Fc и (ii) лигандсвязывающий домен, где указанная область Fc является способной к связыванию с указанной НК-клеткой или ее предшественником, и дополнительно содержащая наполнитель или фармакологически приемлемый носитель.

55. Фармацевтическая композиция по п.54, где рекомбинантный полипептид является нековалентно связанным с НК-клеткой.

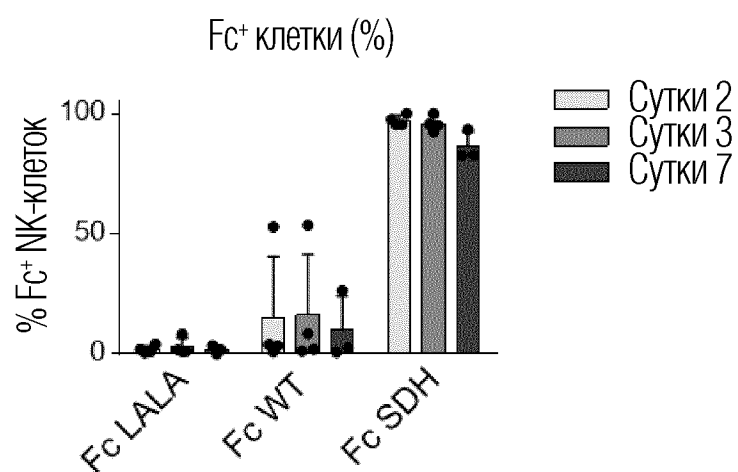




ФИГ. 1С



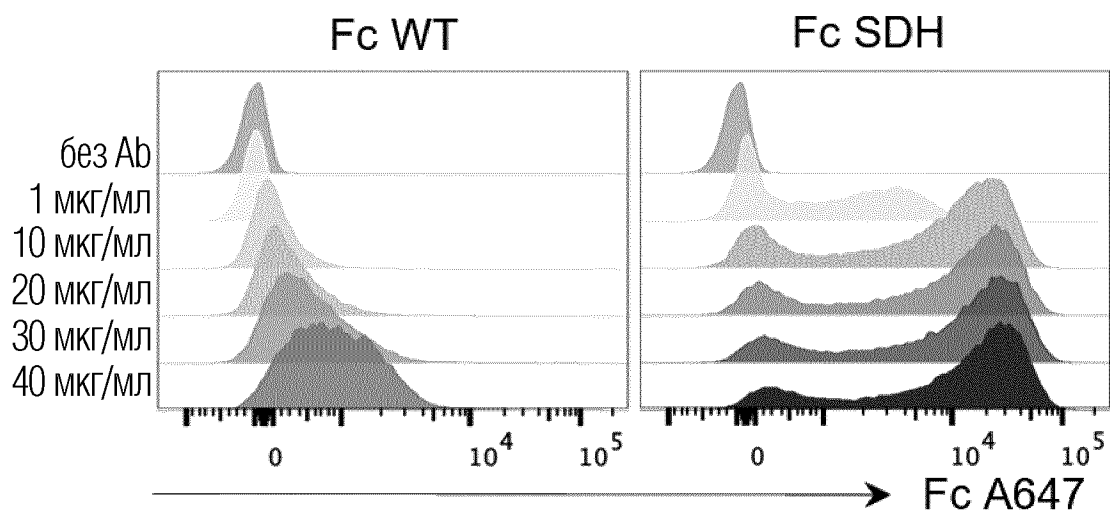
ФИГ. 2А



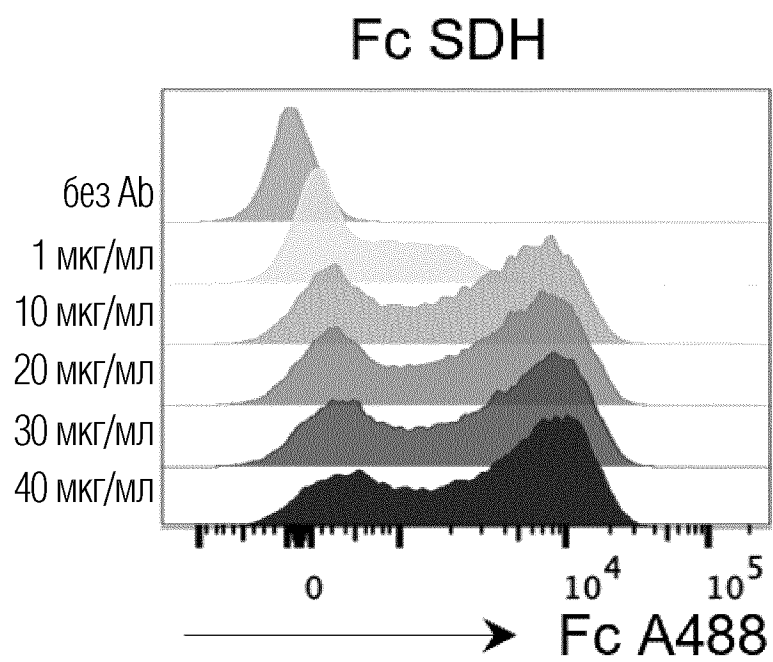
ФИГ. 2В



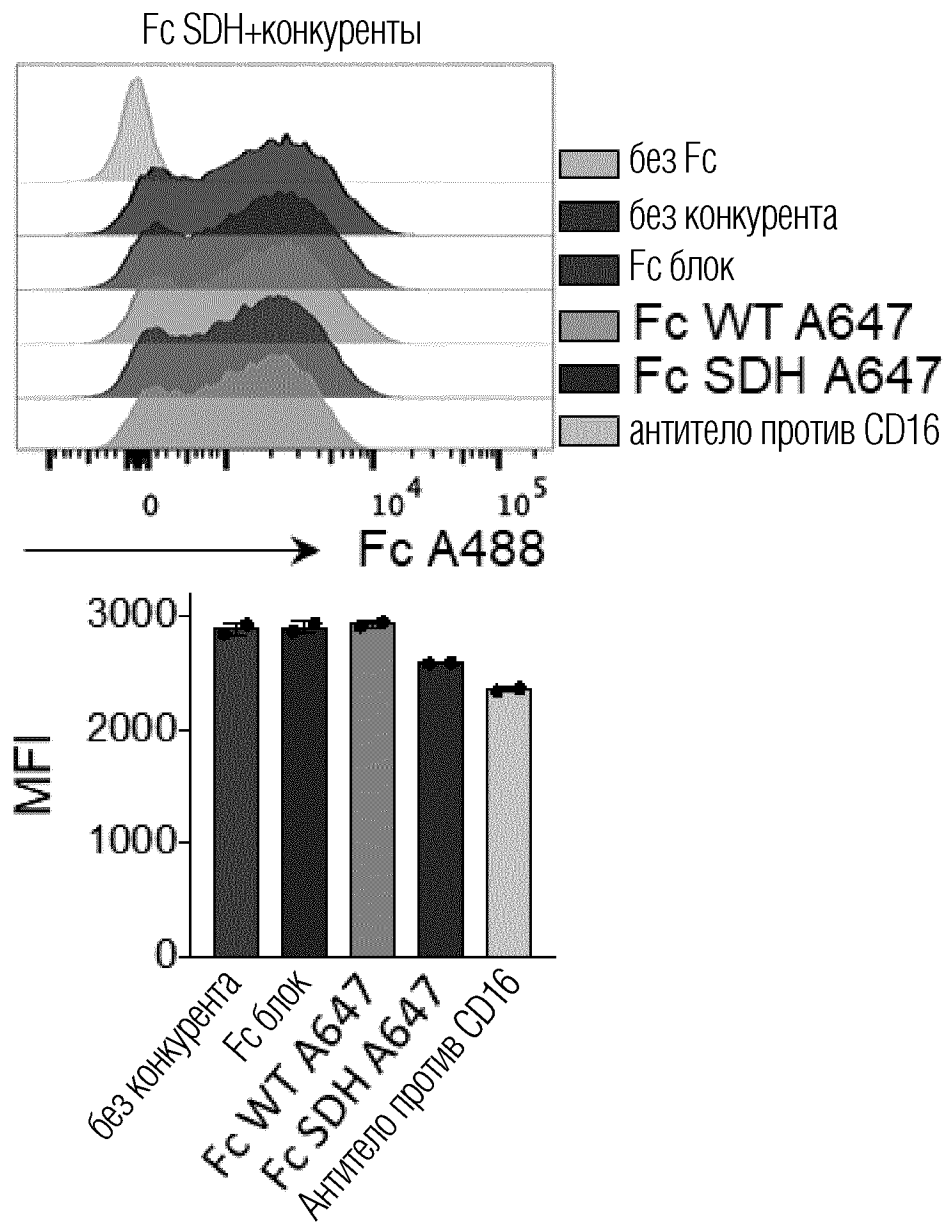
ФИГ. 2С



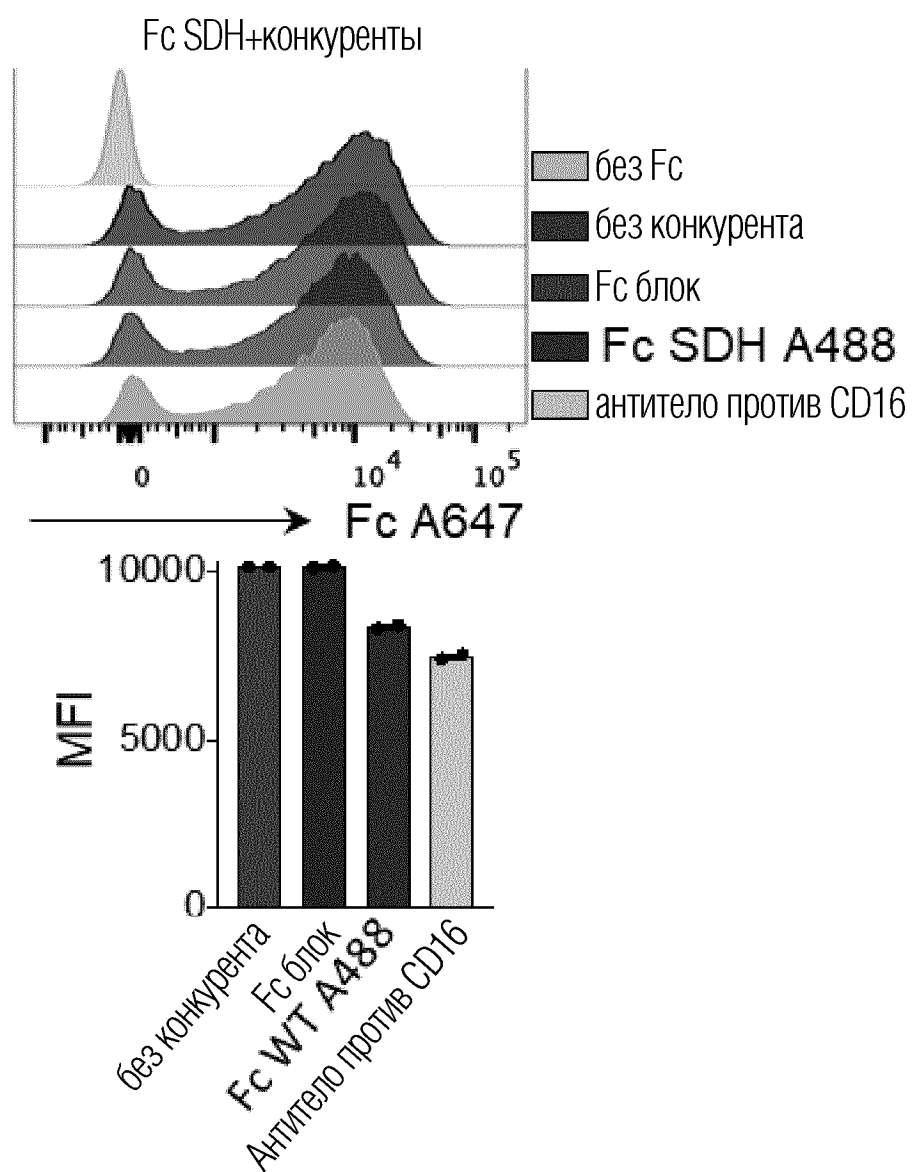
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



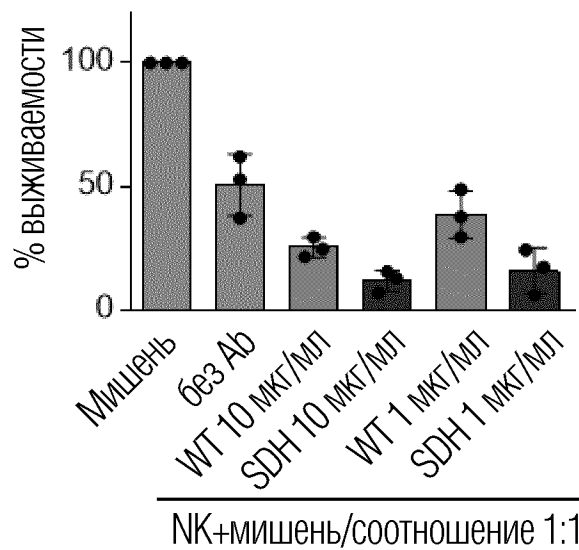
ФИГ. 3С



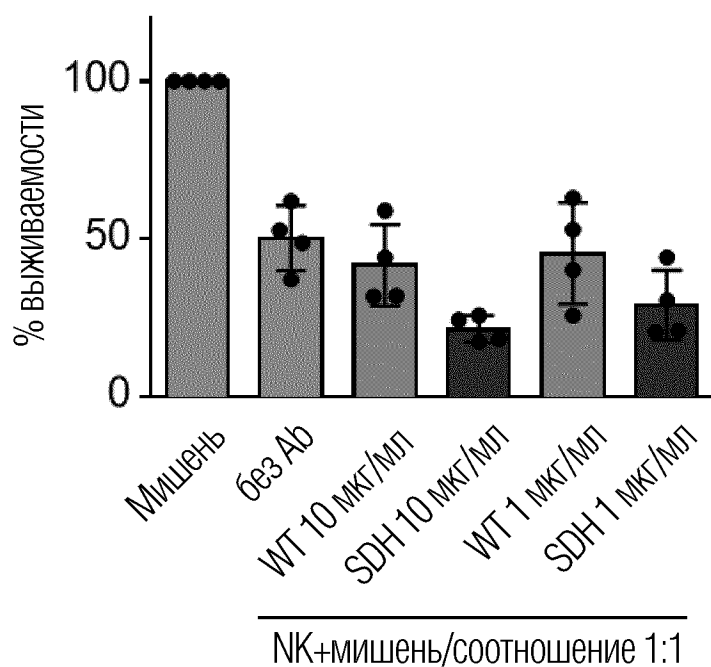
ФИГ. 3D

ФИГ. 4

NK-клетки, «вооруженные» / без промывки

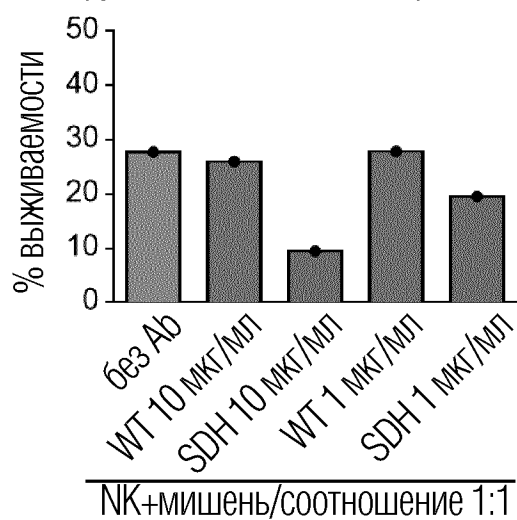


ФИГ. 4А



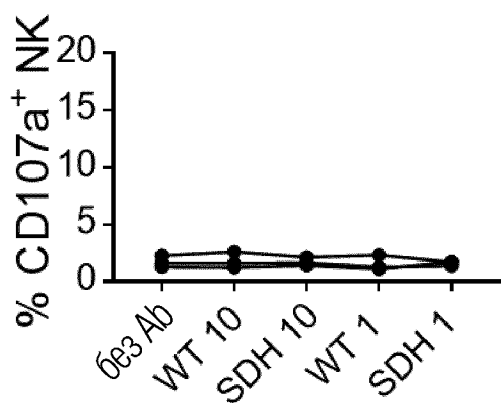
ФИГ. 4В

Вооруженные NK-клетки через 24 час



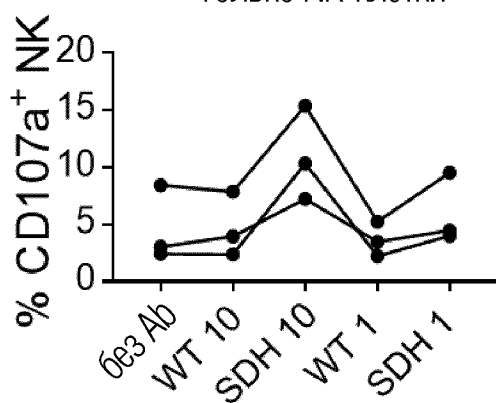
ФИГ. 4С

Только
NK-клетки



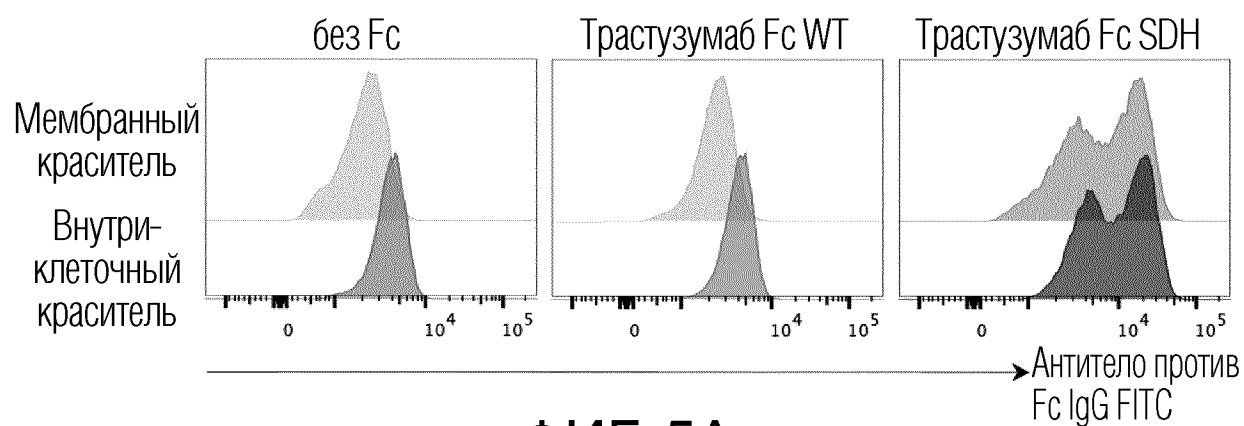
Только NK-клетки

NK-клетки+
клетки-мишени

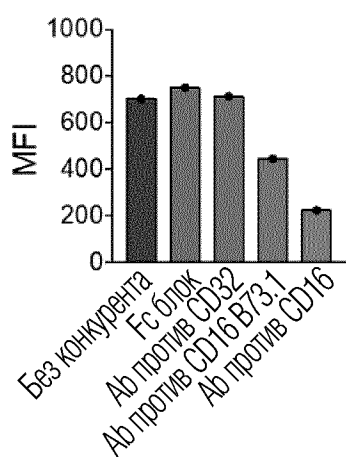
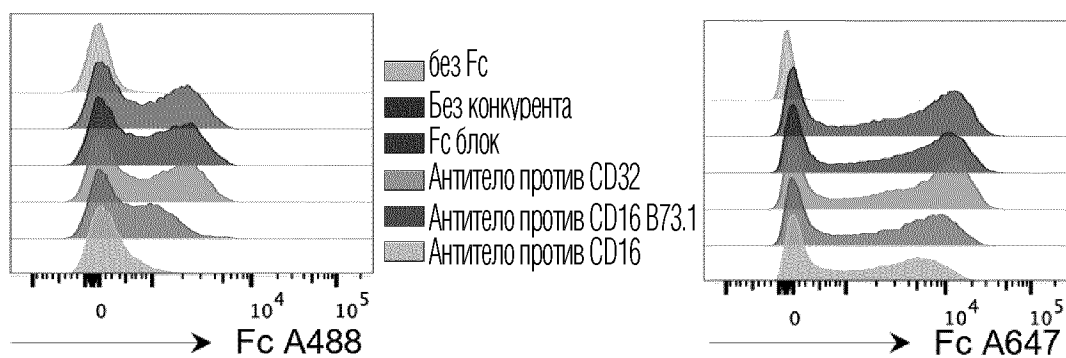


NK-клетки + клетки-мишени

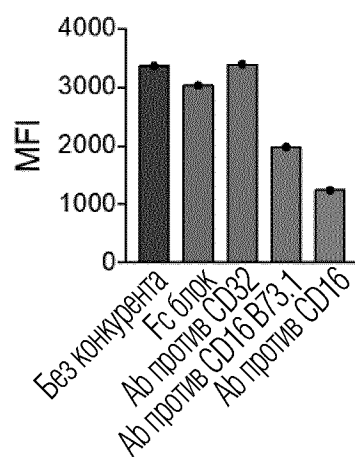
ФИГ. 4D



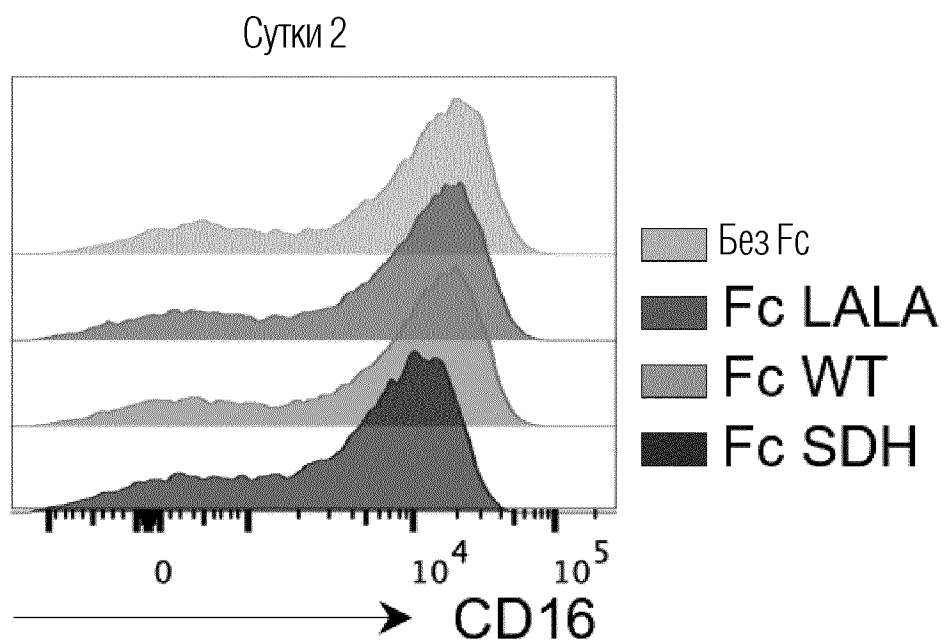
ФИГ. 5А



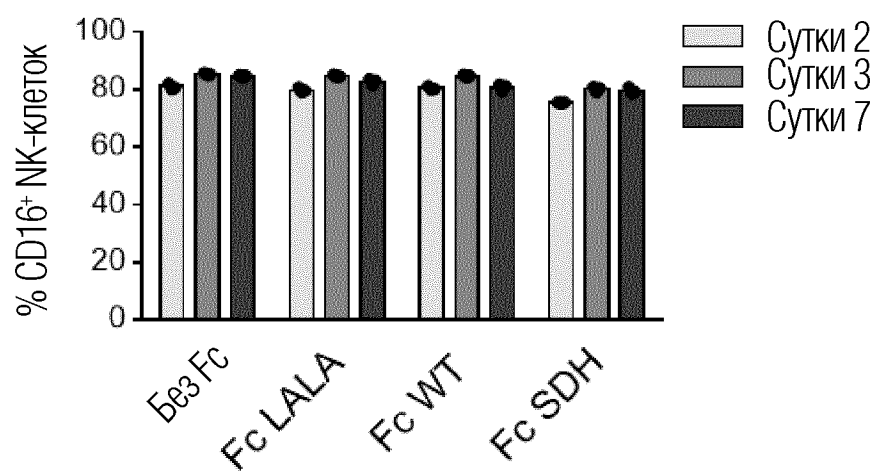
ФИГ. 5В



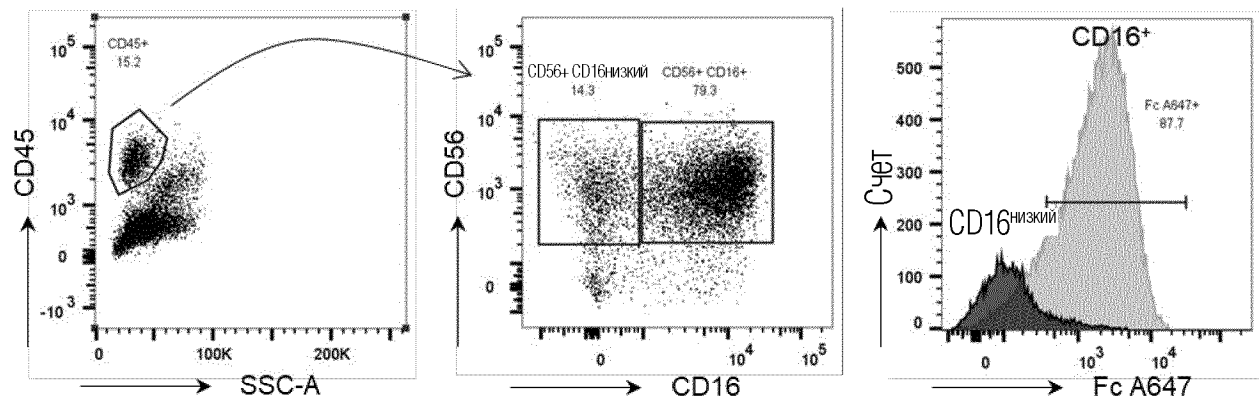
ФИГ. 5С



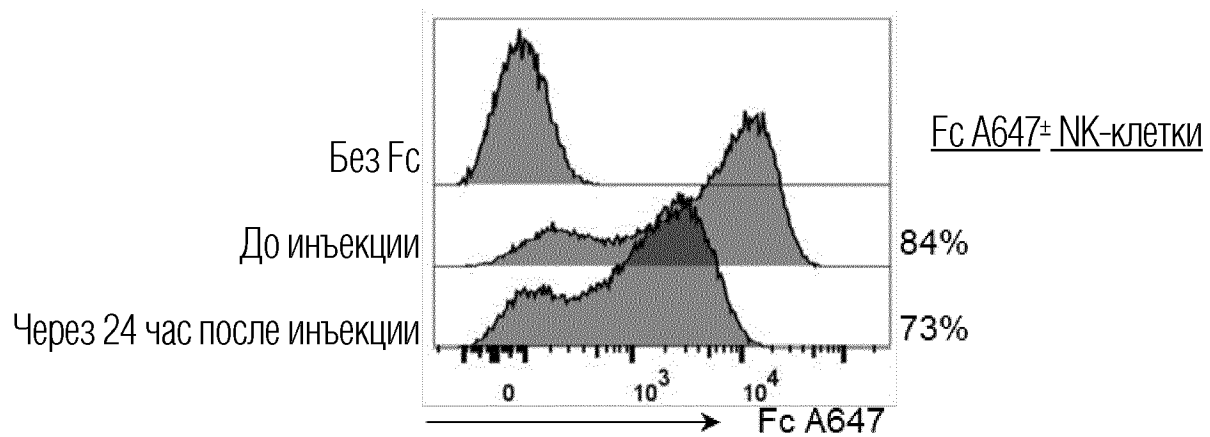
ФИГ. 6А



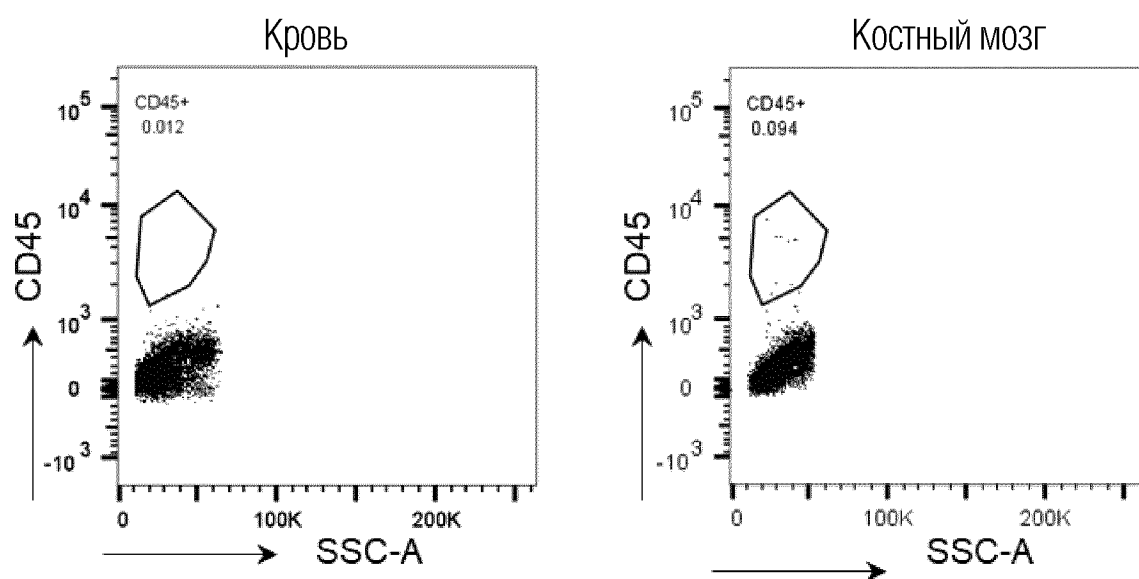
ФИГ. 6В



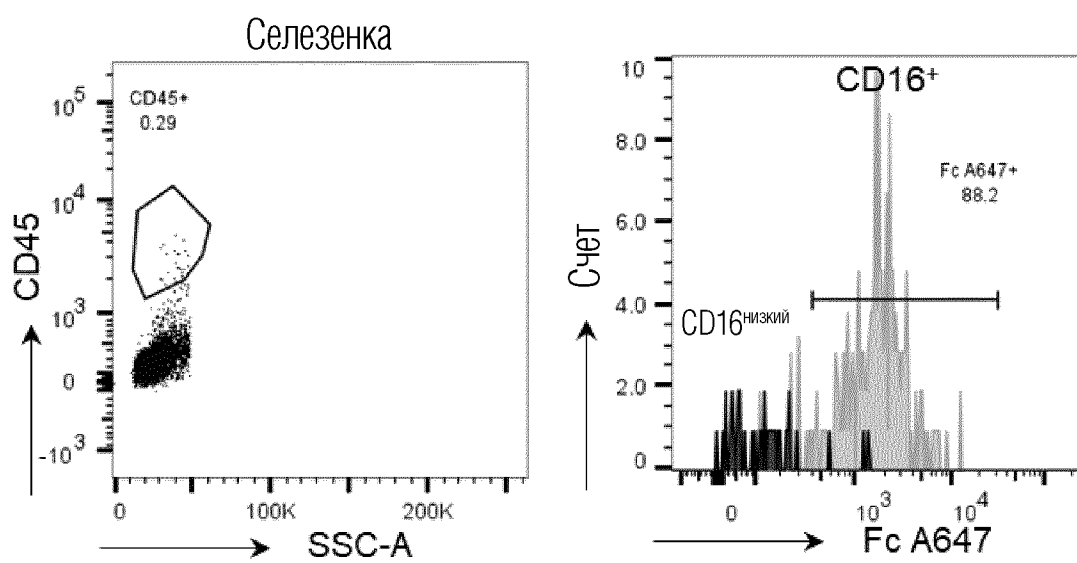
ФИГ. 7А



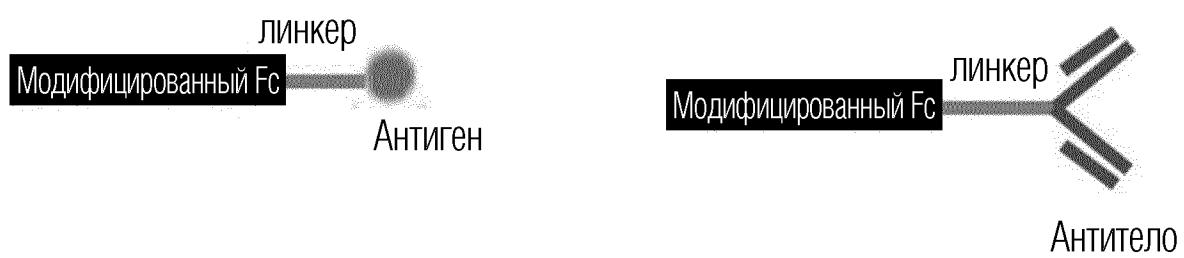
ФИГ. 7В



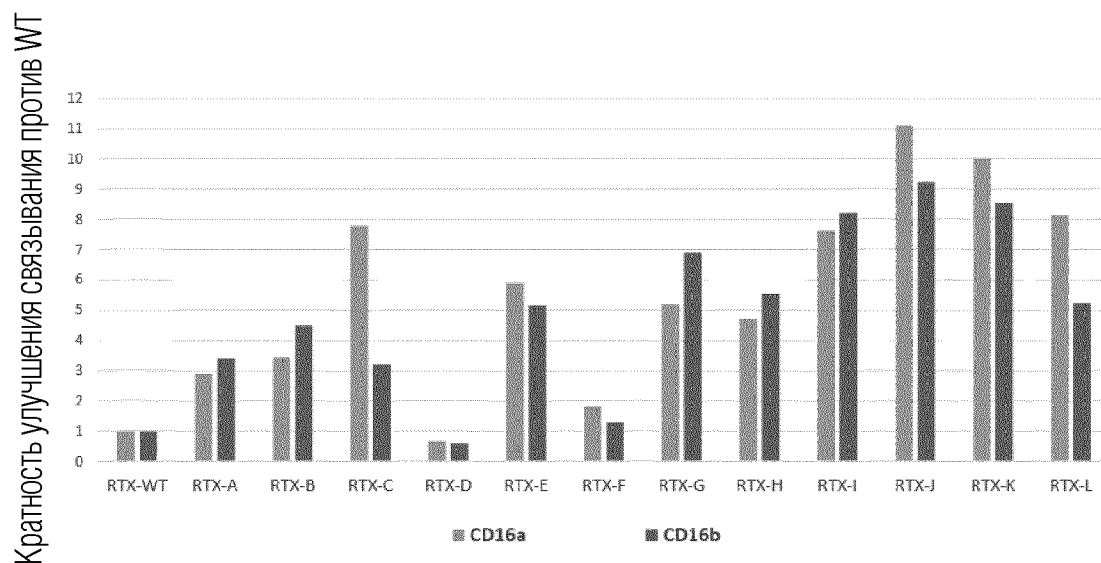
ФИГ. 7С



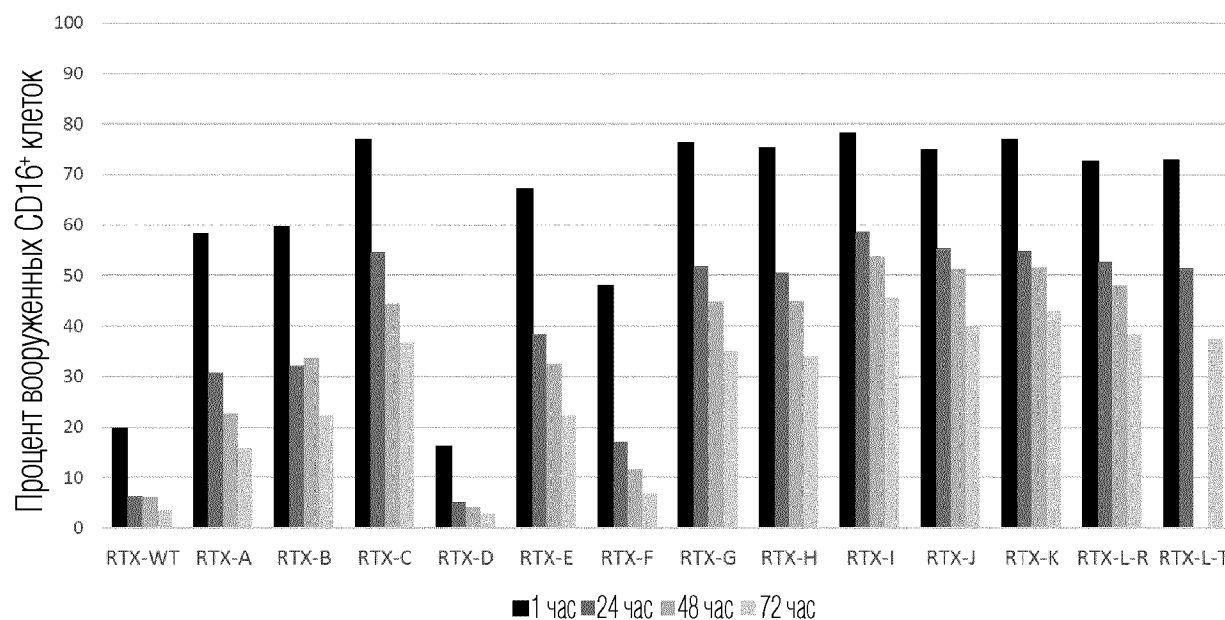
ФИГ. 7D



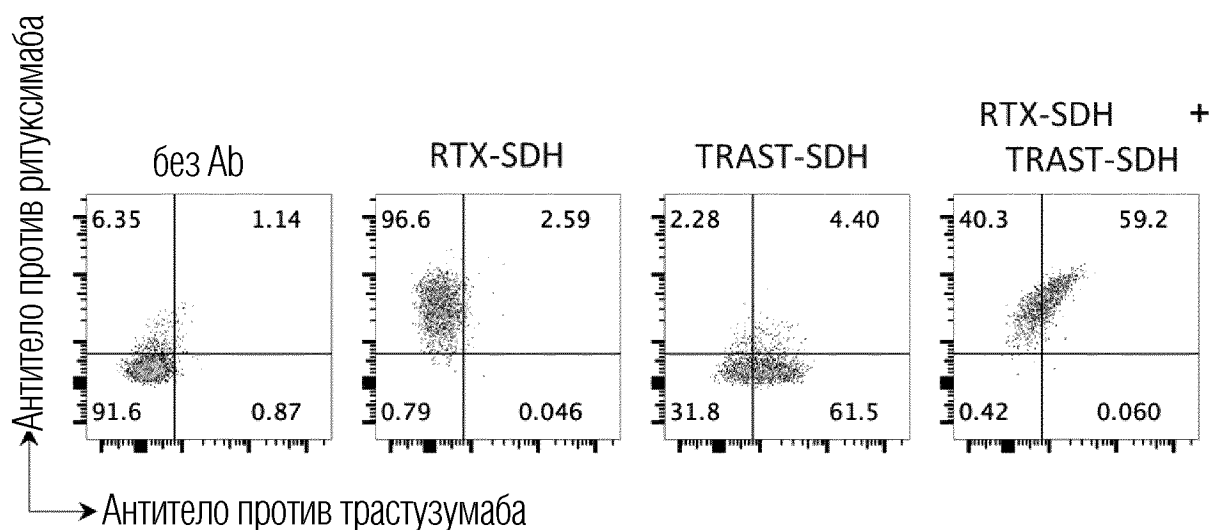
ФИГ. 8



ФИГ. 9А

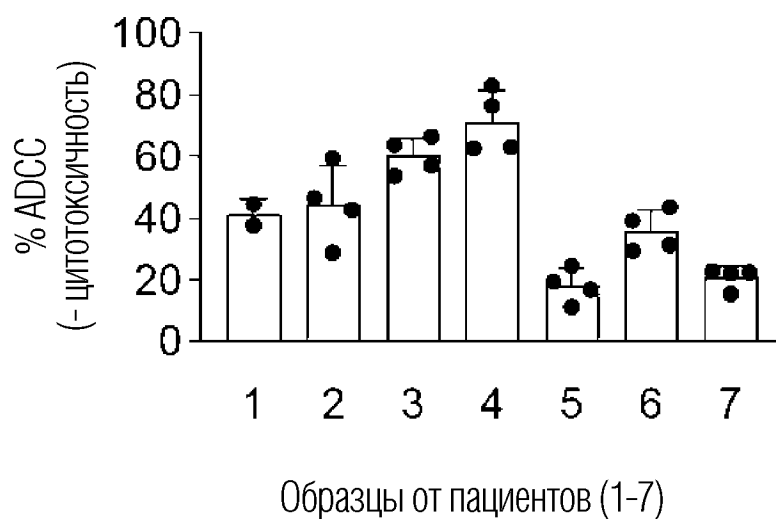


ФИГ. 9В



ФИГ. 10

Эффективность *ex vivo* вооруженных НК-клеток с рекомбинантным ритуксимабом Fc для первичных злокачественных клеток В-лимфомы



ФИГ. 11