

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044644**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.09.19**

**(21)** Номер заявки  
**202091887**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.02.08**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)

---

**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ  
МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ, КОТОРЫЕ АКТИВИРУЮТ  
ЕСТЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ-КИЛЛЕРЫ**

---

**(31)** 62/628,178

**(32)** 2018.02.08

**(33)** US

**(43)** 2020.10.23

**(86)** PCT/US2019/017284

**(87)** WO 2019/157332 2019.08.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Чан Грегори П., Чзунг Энн Ф.,  
Гринберг Ася, Гутьеррес Ева, Хани  
Уилльям, Вагтманн Николай, Ланд  
Бредли М., Принц Бьянка (US)**

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

**(56)** US-A1-20170368169  
WO-A1-2017211873  
US-A1-20090226442  
WO-A1-2017165683  
SMITS, NC et al.: Designing multivalent proteins based on natural killer cell receptors and their ligands as immunotherapy for cancer. Expert Opinion on Biological Therapy. September 2016, Epub 9 June 2016, Vol. 16, No. 9; pages 1105-1112; DOI: 10.1080/14712598.2016.1195364  
WO-A1-2019051308

---

**(57)** В изобретении описана комбинированная терапия рака с помощью мультиспецифического связывающего белка, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном, рецептором NKG2D и CD16 в комбинации со вторым противораковым агентом. Также описаны фармацевтические композиции мультиспецифического связывающего белка и терапевтические способы, пригодные для лечения рака в комбинации со вторым противораковым агентом.

---

**B1**

**044644**

**044644**

**B1**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет предварительной заявки на патент США № 62/628178, поданной 8 февраля 2018 г., раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки во всей ее полноте для всех целей.

### **Область изобретения**

В настоящем изобретении описана комбинированная терапия рака с помощью мультиспецифического связывающего белка, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном, рецептором NKG2D и CD16 в комбинации со вторым противораковым агентом. Также описаны фармацевтические композиции мультиспецифического связывающего белка и терапевтические способы, применимые для лечения рака в комбинации со вторым противораковым агентом.

### **Уровень техники**

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

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

Естественные клетки-киллеры (NK) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют примерно 15% циркулирующих лимфоцитов. NK-клетки проникают практически во все ткани и первоначально характеризовались своей способностью эффективно убивать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсibilизации. Активированные NK-клетки убивают клетки-мишени посредством аналогичных цитотоксических Т-клеток, то есть через цитолитические гранулы, которые содержат перфорин и гранзимы, а также через пути рецепторов смерти. Активированные NK-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN-гамма и хемокины, которые способствуют привлечению других лейкоцитов в ткани-мишени.

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

### **Сущность изобретения**

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления гибели опухолевых клеток прямо или опосредованно, причем способ включает воздействие на опухоль и естественные клетки-киллеры белка, содержащего: (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16; в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из: блокатора контрольных точек; цитокина; агониста TLR; агониста STING; химиотерапевтического агента; агента, нацеленного на рак, который взаимодействует со специфическими молекулами в раковых клетках, которые участвуют в росте или выживании раковых клеток, включая, например, ингибиторы киназы, такие как ибрутиниб, вемурафениб или гливек; онколитического вируса; вакцины; радиации; адоптивной терапии NK, которая включает инфузию размноженных ex vivo NK-клеток, адоптивной терапии Т-клетками, которая включает инфузию ex vivo размноженных Т-клеток, включая клетки, которые были модифицированы in vitro для экспрессии химерного антигенного рецептора (например, CAR-T клетки); терапии трансплантации стволовых клеток (SCT) и агента, вызывающего клеточное старение.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего: (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16; или состав, содержащий белок; в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек,

цитокина, агониста TLR, агониста STING, химиотерапевтического агента, агента, нацеленного на рак, онколитического вируса, вакцины, радиации, адоптивной терапии NK, которая включает инфузию размноженных ex vivo NK-клеток, адоптивной терапии Т-клетками, которая включает инфузию ex vivo размноженных Т-клеток, включая клетки, которые были модифицированы in vitro для экспрессии химерного антигенного рецептора (например, CAR-Т клетки), терапии трансплантации стволовых клеток (SCT) и агента, вызывающего клеточное старение.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с блокаторм контрольных точек, выбранным из: антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к KIR, антитела к NKG2A, антитела к LAG3 и антитела к TIM3.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с цитокином, включая интерфероны и интерлейкины, такие как IL-2, IL-15, IL-12, INF $\alpha$ , IL-21, PEG-IL-2 (модифицированный полиэтиленгликолем интерлейкин-2) и гетеродимеры IL15/IL15R.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агонистом TLR, выбранным из агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR7/8, агониста TLR9, агониста TLR4 и агониста TLR3.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агонистом STING ADU-S100.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с химиотерапевтическим агентом, включающим алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид, мехлорэтамин, хлорамбуцил, мелфалан, дакарбазин (DTIC), нитрозомочевины, темозоломид (пероральный дакарбазин); антрациклины, такие как даунорубин, доксорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон и валрубин; разрушители цитоскелета, такие как паклитаксел, наб-паклитаксел, доцетаксел, абраксан и таксотер; эпотилоны; ингибиторы гистондеацетилазы, такие как вориностат и ромидепсин; ингибиторы топоизомеразы I, такие как иринотекан и топотекан; ингибиторы топоизомеразы II, такие как этопозид, тенипозид и тафлупозид; ингибиторы киназы, такие как бортезомиб, эрлотиниб, gefитиниб, иматиниб, вемурафениб и висмодегиб; аналоги нуклеотидов и аналоги-предшественники, такие как азацитидин, азатиоприн, капецитабин; пептидные антибиотики, такие как блеомицин и актиномицин; агенты на основе платины, такие как карбоплатин, цисплатин и оксалиплатин; ретиноиды, такие как третиноин и алитретиноин; и алкалоиды барвинка и их производные, такие как винбластин, винкрестин, виндезин и винорелбин.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с блокаторм контрольных точек, выбранным из ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, ипилимумаба, тремелиумаба, лирилумаба и монализумаба.

В настоящем изобретении предлагается способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агони-

стом TLR, выбранным из: R848/резиквимода, VTX-2337, имиквимода и CpG-олигодезоксинуклеотида.

В настоящем изобретении предлагается мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с опухоль-ассоциированным антигеном на раковой клетке и рецептором NKG2D, и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах для активации естественных клеток-киллеров, фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы с применением таких мультиспецифических белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака. Такие белки могут взаимодействовать с более чем одним типом рецептора, активирующего NK, и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В определенных вариантах осуществления белок может агонизировать NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и/или яванские макаки. Различные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения описаны более подробно ниже.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок может включать первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и Fc-домен антитела, его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок является трехвалентным, включающим первый и второй антигенсвязывающий участок, оба связывающие один и тот же опухоль-ассоциированный антиген; третий антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; и Fc-домен антитела, часть которого достаточна для связывания CD16.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок является четырехвалентным, включающим первый и второй антигенсвязывающий участок, оба связывающие один и тот же опухоль-ассоциированный антиген; третий и четвертый антигенсвязывающий участок, оба связывающие NKG2D; и Fc-домен антитела, часть которого достаточна для связывания CD16.

Каждый антигенсвязывающий участок может включать переменный домен тяжелой цепи антитела и переменный домен легкой цепи антитела (например, расположенный как в антителе или слитый вместе с scFv), или один или более антигенсвязывающих участков могут быть однодоменным антителом, таким как V<sub>H</sub>Н-антитело, такое как антитело верблюдовых, или V<sub>NAR</sub>-антитело, подобное тем, которые обнаружены у хрящевых рыб. В некоторых случаях опухоль-ассоциированный антиген может быть выбран из группы, состоящей из HER2, CD20, CD33, антигена созревания В-клеток (BCMA), EpCAM, CD2, CD19, CD25, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, CLL1/CLEC12A, FLT3, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, HLA-E и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем каждый из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотным последовательностям переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антигенсвязывающего участка, раскрытого в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи включает последовательности определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (CDR1), определяющей комплементарности области 2 (CDR2) и определяющей комплементарности области 3 (CDR3) и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как описано в табл. 1 антигенсвязывающего участка.

Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 47, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 92), последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 58), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 113); и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 60), последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 61), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 47, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%





стью (SEQ ID NO: 128), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 129).

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41 и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 42).

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 43) и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 44).

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 69) и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 70).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе мультиспецифического связывающего белка для лечения рака. Типовые виды рака для лечения с использованием мультиспецифических связывающих белков включают, например, карциному, экспрессирующую HER2.

#### **Краткое описание графических материалов**

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

На фиг. 2 представлен мультиспецифический связывающий белок, содержащий NKG2D-связывающий домен в формате scFv (правое плечо), опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (левое плечо) и Fc-домен или его часть, которые связываются с CD16.

На фиг. 3 представлен TriNKET в форме триомаба, который представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, которое имеет IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител, каждое с одной легкой и одной тяжелой цепью, которые происходят от двух родительских антител. Форма триомаба представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую  $1/2$  антитела крысы и  $1/2$  антитела мыши.

На фиг. 4 представлен TriNKET в форме общей легкой цепи (LC), в которой используется технология "выступы-во-впадины" (КИН). КиН представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, и Fc, стабилизированный мутациями гетеродимеризации. TriNKET в формате КиН может быть гетеродимерной конструкцией с 2 fab, связывающимися с мишенью 1 и мишенью 2, содержащей 2 разных тяжелых цепи и общую легкую цепь, которая спаривается с обоими НС.

На фиг. 5 представлен TriNKET в форме иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig<sup>TM</sup>), который объединяет домены связывания мишеней двух моноклональных антител через гибкие природные линкеры и приводит к четырехвалентной IgG-подобной молекуле. DVD-Ig<sup>TM</sup> представляет собой гомодимерную конструкцию, в которой вариабельный домен, нацеленный на антиген 2, слит с N-концом вариабельного домена Fab, нацеленного на антиген 1. Конструкция содержит нормальный Fc.

На фиг. 6 представлен TriNKET в форме ортогональной поверхности Fab (Ortho-Fab), который представляет собой гетеродимерную конструкцию, которая содержит 2 Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Спаривание LC-НС обеспечивается ортогональной поверхностью. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

На фиг. 7 представлен TrinKET в формате "2 в 1Ig".

На фиг. 8 представлен TriNKET в формате ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатической мутацией в Fc.

На фиг. 9 представлен TriNKET в форме обмена Fab-фрагментами: антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекулы) на пару тяжелых-легких цепей из другой молекулы, что приводит к образованию биспецифических антител. Форма обмена Fab-фрагментами (cFae) представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации.

На фиг. 10 представлен TriNKET в форме тела SEED, который представляет собой гетеродимер, содержащий 2 Fab, связывающихся с мишенью 1 и 2, и Fc, стабилизированные мутациями гетеродимеризации.

На фиг. 11 представлен TriNKET в форме LuZ-Y, в которой лейциновая "молния" используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных НС. Форма LuZ-Y представляет собой гетеродимер, содержащий 2 различных scFab, связывающихся с мишенью 1 и 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается с помощью мотивов лейциновой "молнии", слитых с C-концом Fc.

На фиг. 12 представлен TriNKET в форме Cov-X-тела.

На фиг. 13А-13В представлен TriNKET в формах κL-тела, которые представляют собой гетеродимерные конструкции с 2 различными Fab, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: Fab1, нацеленный на антиген 1, содержит каппа-LC, тогда как второй Fab, нацеленный на антиген 2, содержит лямбда LC. На фиг. 13А представлено типовое представление одной формы κL-тела; на фиг. 13В представлено типовое представление другого κL-тела.

На фиг. 14 представлен график, демонстрирующий аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D человека в ИФА анализе.

На фиг. 15 представлен график, демонстрирующий аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D яванского макака в ИФА анализе.

На фиг. 16 представлен график, демонстрирующий аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D мыши в ИФА анализе.

На фиг. 17 представлен график, демонстрирующий связывание NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с клетками EL4, экспрессирующими NKG2D человека, с помощью проточной цитометрии, демонстрирующей среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), кратную по сравнению с фоном.

На фиг. 18 представлен график, демонстрирующий связывание NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с клетками EL4, экспрессирующими NKG2D мыши, с помощью проточной цитометрии, демонстрирующей среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), кратную по сравнению с фоном.

На фиг. 19 представлен график, демонстрирующий специфическую аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D-Fc человека путем конкуренции с природным лигандом ULBP-6.

На фиг. 20 представлен график, демонстрирующий специфическую аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D-Fc человека путем конкуренции с природным лигандом MICA.

На фиг. 21 представлен график, демонстрирующий специфическую аффинность связывания NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) с рекомбинантным NKG2D-Fc человека путем конкуренции с природным лигандом Rae-1 дельта.

На фиг. 22 представлен график, демонстрирующий активацию NKG2D человека посредством NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) путем количественного определения процента TNF-альфа-положительных клеток, которые экспрессируют NKG2D-CD3-дзета слитые белки человека.

На фиг. 23 представлен график, демонстрирующий активацию NKG2D мыши посредством NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) путем количественного определения процента TNF-альфа-положительных клеток, которые экспрессируют NKG2D-CD3-дзета слитые белки мыши.

На фиг. 24 представлен график, демонстрирующий активацию NK-клеток человека NKG2D-связывающими доменами (перечисленных в виде клонов).

На фиг. 25 представлен график, демонстрирующий активацию NK-клеток человека NKG2D-связывающими доменами (перечисленных в виде клонов).

На фиг. 26 представлен график, демонстрирующий активацию NK-клеток мыши NKG2D-

связывающими доменами (перечисленных в виде клонов).

На фиг. 27 представлен график, демонстрирующий активацию NK-клеток мыши NKG2D-связывающими доменами (перечисленных в виде клонов).

На фиг. 28 представлен график, демонстрирующий цитотоксический эффект NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов) на опухолевые клетки.

На фиг. 29 представлен график, демонстрирующий температуру плавления NKG2D-связывающих доменов (перечисленных в виде клонов), измеренную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии.

На фиг. 30 представлен график, демонстрирующий усиленную активацию NK-клеток человека мультиспецифическими связывающими белками.

На фиг. 31 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток человека в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 32 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток человека в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 33 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток человека в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 34 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток человека в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 35 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток мыши в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 36 представлен график, демонстрирующий, что мультиспецифические связывающие белки индуцируют более высокие уровни цитотоксичности NK-клеток мыши в отношении опухолевых клеток-мишеней.

На фиг. 37 представлен профиль связывания нацеленных на CD33 TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4. На фиг. 37 продемонстрировано связывание двух TriNKET, когда CD33-связывающий домен используется в качестве второго нацеливающего плеча.

На фиг. 38 представлен профиль связывания нацеленных на HER2 TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4. На фиг. 38 продемонстрированы те же два NKG2D-связывающих домена, которые в таких условиях соединены со вторым нацеливающим плечом HER2.

На фиг. 39 представлен профиль связывания нацеленных на BCMA TriNKET с NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4.

На фиг. 40 представлена гистограмма нацеленных на CD20 TriNKET, которые связываются с NKG2D, экспрессируемым на клетках EL4. Неокрашенные клетки EL4 использовали в качестве отрицательного контроля для сигнала флуоресценции. Неокрашенный: заполненный; CD20-TriNKET-F04: сплошная линия; CD20-TriNKET-C26: пунктирная линия.

На фиг. 41 представлен профиль связывания нацеленных на CD33 TriNKET с CD33, экспрессируемым на клетках ОМЛ MV4-11 человека.

На фиг. 42 представлен профиль связывания нацеленных на HER2 TriNKET с HER2, экспрессируемым на клетках 786-О рака почек человека.

На фиг. 43 представлен профиль связывания нацеленных на BCMA TriNKET с BCMA, экспрессируемым на клетках миеломы MM. 1S человека.

На фиг. 44 представлена гистограмма нацеленных на CD20 TriNKET, которые связываются с CD20, экспрессируемым на поверхности клеток лимфомы EL4 человека. Неокрашенные клетки использовали в качестве отрицательного контроля для сигнала флуоресценции. Неокрашенный: заполненный; CD20-TriNKET-F04: сплошная линия; CD20-TriNKET-C26: пунктирная линия.

На фиг. 45A-45B представлена гистограммы синергетической активации NK-клеток с использованием CD16 и NKG2D. На фиг. 45A продемонстрированы уровни CD107a; на фиг. 45B продемонстрированы уровни IFN $\gamma$ ; на фиг. 45C продемонстрированы уровни CD107a. Графики демонстрируют среднее значение ( $n=2$ )  $\pm$ SD. Данные представляют собой пять независимых экспериментов с использованием пяти различных здоровых доноров.

На фиг. 46 представлена гистограмма, демонстрирующая активацию NK-клеток с использованием TriNKET, нацеленных на NKG2D и CD16. Во всех случаях испытанные антитела имели изотип IgG1 человека. Графики демонстрируют среднее значение ( $n=2$ )  $\pm$ SD.

На фиг. 47A-47C представлена гистограмма, демонстрирующая, что TriNKET и трастузумаб способны активировать первичные NK-клетки человека в совместной культуре с HER2-положительными опухолевыми клетками человека, на что указывает увеличение дегрануляции CD107a и выработки цито-

кинов IFN $\gamma$ . По сравнению с моноклональным антителом трастузумабом оба TriNKET продемонстрировали превосходную активацию NK-клеток человека с различными клетками HER2 рака человека. На фиг. 47A продемонстрировано, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками SkBr-3. На фиг. 47B продемонстрировано, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками Colo201. На фиг. 47C продемонстрировано, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками HCC1954.

На фиг. 48A-48B представлена гистограмма, демонстрирующая TriNKET-опосредованную активацию покоящихся или IL-2-активированных NK-клеток человека в совместной культуре с CD33-экспрессирующей линией клеток ОМЛ человека MV4-11. Фиг. 48A показывает TriNKET-опосредованную активацию покоящихся NK-клеток человека. На фиг. 48B продемонстрирована TriNKET-опосредованная активация IL-2-активированных NK-клеток человека от того же донора.

На фиг. 49A-49B представлена гистограмма, демонстрирующая усиление TriNKET цитотоксической активности с использованием активированных IL-2 и покоящихся NK-клеток человека. На фиг. 49A продемонстрирован процент специфического лизиса опухолевых клеток SkBr-3 покоящимися NK-клетками человека. На фиг. 49B продемонстрирован процент специфического лизиса опухолевых клеток SkBr-3 активированными IL-2 NK-клетками человека.

На фиг. 50A-50B представлены гистограммы, демонстрирующие, что TriNKET обеспечивают наибольшее преимущество против рака со средним и низким уровнем HER2 по сравнению с трастузумабом. На фиг. 50A продемонстрировано уничтожение активированными NK-клетками человека опухолевых клеток SkBr-3 с высоким уровнем HER2. На фиг. 50B продемонстрировано уничтожение активированными NK-клетками человека опухолевых клеток 786-O с низким уровнем HER2. TriNKET обеспечивают большее преимущество по сравнению с трастузумабом против клеток рака с низким уровнем экспрессией HER2.

На фиг. 51A-51C представлены гистограммы, демонстрирующие экспрессию высокоаффинного Fc $\gamma$ I (CD64) на поверхности трех линий клеток ОМЛ человека, клеточной линии Molm-13 (фиг. 51A), клеточной линии Mv4-11 (фиг. 51B) и клеточной линии THP-1 (фиг. 51C).

На фиг. 52A-52B представлены линейные графики опосредованной моноклональным антителом или TriNKET активации NK-клеток человека в совместной культуре с клетками либо Molm-13 (фиг. 52B), либо THP-1 (фиг. 52A).

На фиг. 53A-53C представлены линейные графики анализов цитотоксичности NK-клеток человека с использованием трех линий клеток ОМЛ человека в качестве мишеней. На фиг. 53A продемонстрировано, что клетки Mv4-11, которые экспрессируют CD64, но на более низком уровне, чем THP-1, показали пониженную эффективность в случае с моноклональным анти-CD33. На фиг. 53B продемонстрировано, что моноклональное антитело к CD33 показывает хорошую эффективность против клеток Molm-13, которые не экспрессируют CD64. На фиг. 53C продемонстрировано, что клетки THP-1 не проявляли эффекта в случае только с моноклональным анти-CD33. Идентичность линейных графиков, отмеченных на фиг. 53C, также применима к линейным графикам на фиг. 53A-53B.

На фиг. 54A и 54B представлены гистограммы, демонстрирующие, что В-клетки здорового донора чувствительны к лизису, опосредованному TriNKET.

На фиг. 54C и 54D представлены гистограммы, демонстрирующие, что миелоидные клетки устойчивы к опосредованному TriNKET лизису.

На фиг. 55 представлены линейные графики TriNKET-опосредованного hPBMC уничтожения опухолевых клеток SkBr-3 в длительных совместных культурах.

На фиг. 56 представлена блок-схема схемы исследования эффективности подкожной SC2.2 для RMA/S-HER2.

На фиг. 57 представлены линейные графики, показывающие, что SC2.2 не влияет на рост подкожной опухоли RMA/S-HER2.

На фиг. 58A-58B представлены графики, демонстрирующие связывание *in vitro* с помощью mCFAE-C26.99 TriNKET. 60 мкг/мл указанных антител с четырехкратными разведениями добавляли к  $2 \times 10^5$  опухолевым клеткам B16F10 (фиг. 58A) или клеткам EL4-mNKG2D (фиг. 58B). Связывание оценивали с использованием вторичного конъюгированного с PE антитела козы против мышинового Ig с последующим проточным цитометрическим анализом.

На фиг. 59 представлен график, демонстрирующий повышенную цитотоксичность NK, опосредованную mCFAE-C26.99 TriNKET.

На фиг. 60A-60B представлена противоопухолевая эффективность mCFAE-C26.99 TriNKET в п/к моделях B16F10. Мышам вводили внутрибрюшинно (фиг. 60A) контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 и моноклональное антитело к Тутр-1 мыши или (фиг. 60B) контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 и mCFAE-C26.99 TriNKET, в дозе 150 мкг (6, 8, 10, 12, 14, 16 и 21 дни). Рост опухоли оценивали в течение 28 дней. Графики демонстрируют кривые роста опухоли у отдельных мышей.

На фиг. 61A-61B представлена противоопухолевая эффективность mCFAE-C26.99 TriNKET в в/в

моделях B16F10. На фиг. 61А продемонстрирована опухолевая нагрузка, когда антитела вводили в дозе 150 мкг (4, 6, 8, 11, 13, 15 дни). На фиг. 61В продемонстрирована опухолевая нагрузка, когда антитела вводили в дозе 150 мкг (7, 9, 11, 13, 15 дни). Через 18 дней после опухолевой нагрузки, мышей умерщвляли и оценивали количество метастаз на поверхности легких.

На фиг. 62 представлена гистограмма, показывающая, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с CD20+ клетками Раджи.

На фиг. 63 представлена гистограмма, показывающая активацию NK-клеток человека в культуре с ВСМА-положительными миеломными клетками человека MM.1S.

На фиг. 64 представлен график, демонстрирующий, что TriNKET усиливают лизис NK-клетками человека клеток миеломы KMS12-PE.

На фиг. 65 представлен график, демонстрирующий, что нацеленные на ВСМА TriNKET с различными NKG2D-связывающими доменами усиливают лизис NK-клетками человека клеток миеломы KMS12-PE.

На фиг. 66А-66С представлены линейные графики, демонстрирующие эффекты комбинированной терапии с использованием mNFAE-C26.99 TriNKET и антител к PD-1 в п/к моделях B16F10. На фиг. 66А представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 с моноклональным антителом к IgG2a 2A3 крысы или mFAE-C26.99. На фиг. 66В представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип или моноклональное антитело к PD-1, клон RPM1-14. На фиг. 66С представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили комбинацию mFAE-C26.99 и моноклонального антитела к PD-1. Рост опухоли оценивали в течение 30 дней. Графики демонстрируют кривые роста опухоли у отдельных мышей.

На фиг. 67А-67С представлены линейные графики, демонстрирующие эффекты комбинированной терапии с использованием mNFAE-C26.99 TriNKET и рекомбинантного IL-2 человека в п/к моделях B16F10. На фиг. 67А представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 или mFAE-C26.99. На фиг. 67В представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип или IL-2. На фиг. 67С представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили комбинацию mFAE-C26.99 и IL-2. Рост опухоли оценивали в течение 40 дней у 3 мышей из комбинированной группы, оставшихся без опухолей. Графики демонстрируют кривые роста опухоли у отдельных мышей.

На фиг. 68 представлен линейный график, демонстрирующий, что триспецифическое связывание в одной молекуле важно для максимальной активности NK-клеток.

На фиг. 69 представлена гетеродимерная конструкция Oasc-Fab, которая включает связывание Fab с мишенью 1 и связывание scFab с мишенью 2, слитые с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в Fc.

На фиг. 70 представлена DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab, связывающихся с антигеном 1 и 2, и Fc стабилизированные мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат дифференциальные S-S мостики, которые обеспечивают правильное сопряжение LC и HC.

На фиг. 71 представлена CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с 2 различными Fab, связывающимися с мишенью 1 и 2, слитыми с Fc, стабилизированными гетеродимеризацией. Домены CL и CH1 и домены VH и VL поменяны местами, например, CH1 соединен с VL, в то время как CL соединен с VH.

На фиг. 72 представлена Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерные конструкции, где связывание Fab с антигеном 2 слито с N-концом HC Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит Fc дикого типа.

На фиг. 73А-73D представлены линейные графики, показывающие процент лизиса клеток-мишеней 786-О покоящимися NK-клетками (фиг. 73А) или NK-клетками, активированными IL-2 (фиг. 73В), IL-12 (фиг. 73С) или IL-15 (фиг. 73D) в присутствии трастузумаба или HER2-TriNKET.

На фиг. 74А-74D представлены линейные графики, показывающие процент лизиса клеток-мишеней Molm-13 покоящимися NK-клетками (фиг. 74А) или NK-клетками, активированными IL-2 (фиг. 74В), IL-12 (фиг. 74С) или IL-15 (фиг. 74D) в присутствии линтузумаба, запатентованного моноклонального антитела против CD33 или CD33-TriNKET.

На фиг. 75А-75D представлены линейные графики, показывающие процент лизиса клеток-мишеней KMS12-PE покоящимися NK-клетками (фиг. 75А) или NK-клетками, активированными IL-2 (фиг. 75В), IL-12 (фиг. 75С) или IL-15 (фиг. 75D) в присутствии моноклонального антитела ВСМА EM-901 или ВСМА-TriNKET.

На фиг. 76А-76D представлены линейные графики, показывающие процент лизиса клеток-мишеней KMS12-PE покоящимися NK-клетками (фиг. 76А) или NK-клетками, активированными помалидомидом

(фиг. 76B), IL-2 (фиг. 76C) или комбинацией IL-2 и помалидомидом (фиг. 76D) в присутствии моноклонального антитела BCMA EM-901 или BCMA-TriNKET.

На фиг. 77A-77B представлены графики, показывающие анализ проточной цитометрии очищенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и клеток-мишеней HCC1954.

На фиг. 78A-78B представлены линейные графики, показывающие рост клеток-мишеней HCC1954 в присутствии CD8<sup>+</sup> Т-клеток и HER2-TriNKET, пембролизумаба ("Keytruda") или их комбинации. CD8<sup>+</sup> Т-клетки, используемые на фиг. 78A и 78B были выделены от разных доноров.

На фиг. 79 представлен линейный график, демонстрирующий рост клеток-мишеней Skbr-3 в присутствии PVMC и HER2-TriNKET, агониста TLR или их комбинации.

На фиг. 80A-80C представлены линейные графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками B16F10 и обработанных 7,5 мг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET или 7,5 мг/кг контрольного изотипа моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 (фиг. 80A), 1 мкг рекомбинантного IL-12 мыши (gmIL-12) или 7,5 мг/кг контрольного изотипа моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 (фиг. 80B) или комбинацию 7,5 мг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET и 1 мкг gmIL-12. (фиг. 80C). На фиг. 80B и 80C, нижние панели представляют графики в небольшом масштабе по оси Y.

На фиг. 81 представлена кривая Каплана-Мейера, показывающая процент животных, выживших после инокуляции опухолевых клеток B16F10 и обработок 7,5 мг/кг контрольным изотипом моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4, 7,5 мг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET, 1 мкг gmIL-12 или комбинации 7,5 мг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET и 1 мкг gmIL-12.

### Подробное описание сущности изобретения

В настоящем изобретении предлагаются мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с опухоль-ассоциированным антигеном на поверхности раковой клетки и рецептором NKG2D, и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах для активации естественной клетки-киллера, фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы с использованием таких мультиспецифических белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака. Различные аспекты настоящего изобретения изложены ниже в разделах; однако аспекты настоящего изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны быть ограничены каким-либо конкретным разделом.

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

Термины в единственном числе, используемые в данном документе, означают "один или более" и включают множественное число, если это не противоречит контексту.

Термин "антигенсвязывающий участок", в контексте данного документа, относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В антителах человека антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых варибельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три сильно расходящихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей называются "гиперварибельными областями", которые расположены между консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом находятся между и рядом с гиперварибельными областями в иммуноглобулинах. В молекуле антитела человека три гиперварибельные области легкой цепи и три гиперварибельные области тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гиперварибельные области каждой из тяжелых и легких цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". У некоторых животных, таких как верблюдовые и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий участок образован одноцепочечным антителом, образующим "однодоменное антитело". Антигенсвязывающие участки могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, которое сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, с использованием пептидного линкера для соединения варибельного домена тяжелой цепи с варибельным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

Термин "опухоль-ассоциированный антиген", в контексте настоящего изобретения, означает любой антиген, включая, но не ограничиваясь этим, белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, ассоциированный с раком. Такой антиген может экспрессироваться в злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например в опухоль-ассоциированных кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах.

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

Термин "эффективное количество" в контексте настоящего изобретения относится к количеству соединения (например, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных

или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений, применений или дозировок, и не предназначено для ограничения конкретным составом или путем введения. Термин "лечение", в контексте настоящего изобретения, включает любой эффект, например, ослабление, уменьшение, модулирование, улучшение или устранение, которое приводит к улучшению патологического состояния, заболевания, расстройства и т.п., или ослабление его симптома.

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

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

Термин "фармацевтически приемлемая соль", в контексте настоящего изобретения, относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислоте или основанию) соединения по настоящему изобретению, которая при введении субъекту способна предоставить соединение по настоящему изобретению или активный метаболит, или его остаток. Как известно специалистам в данной области техники, "соли" соединений по настоящему изобретению могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, но не ограничиваются ими, соляную, бромистоводородную, серную, азотную, перхлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-*p*-сульфовую, винную, уксусную, лимонную, метансульфовую, этансульфовую, муравьиная, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфовую, бензолсульфовую кислоту и тому подобное. Другие кислоты, такие как щавелевая кислота, хотя сами по себе они не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы при получении солей, полезных в качестве промежуточных соединений при получении соединений по настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

Типовые основания включают, но не ограничиваются ими, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочно-земельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы  $NW_4^+$ , где W представляет собой  $C_{1-4}$  алкил и тому подобное.

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

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

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

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

#### I. Белки

В настоящем изобретении предлагаются мультиспецифические связывающие белки, которые связываются с опухоль-ассоциированным антигеном на раковой клетке и рецептором NKG2D, и рецептором CD16 на естественных клетках-киллерах для активации естественной клетки-киллера. Мультиспецифические связывающие белки полезны в фармацевтических композициях и терапевтических способах, описанных в настоящем документе. Связывание мультиспецифического связывающего белка с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на поверхности естественной клетки-киллера усиливает активность естественной клетки-киллера в отношении разрушения раковой клетки. Связывание мультиспецифического связывающего белка с опухоль-ассоциированным антигеном на раковой клетке приводит к тому, что раковая клетка приближается к естественной клетке-киллеру, что облегчает прямое и опосредованное раз-

рушение раковой клетки естественной клеткой-киллером. Дополнительное описание примеров мультиспецифических связывающих белков приведено ниже.

Первый компонент мультиспецифических связывающих белков связывается с экспрессирующими рецептор NKG2D клетками, которые могут включать, но не ограничиваются ими, NK-клетки,  $\gamma\delta$  Т клетки и  $CD8^+ \alpha\beta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления после NKG2D-связывания мультиспецифические связывающие белки могут блокировать природные лиганды, такие как ULBP6 и MICA, от связывания с NKG2D.

Второй компонент мультиспецифических связывающих белков связывается с одним или более опухоль-ассоциированными антигенами, которые могут включать, но не ограничиваются ими HER2, CD20, CD33, BCMA, EpCAM, CD2, CD19, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD-L1.

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

Мультиспецифические связывающие белки могут принимать несколько форматов, как показано в, но не ограничиваясь этим, приведенных ниже примерах. Один формат представляет собой гетеродимерное мультиспецифическое антитело, которое включает первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина. Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc (шарнир-CH2-CH3) домен, первый варибельный домен тяжелой цепи и необязательный первый домен тяжелой цепи CH1. Легкая цепь иммуноглобулина включает варибельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи; вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина легкая цепь иммуноглобулина образует антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина содержит второй Fc (шарнир-CH2-CH3) домен, второй варибельный домен тяжелой цепи и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1, который может соединиться с легкой цепью иммуноглобулина, идентичной той, которая соединиться с первой тяжелой цепью иммуноглобулина, за исключением того, что когда легкая цепь иммуноглобулина соединяется со второй тяжелой цепью иммуноглобулина, полученный антигенсвязывающий участок связывается с опухолевым антигеном. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (фиг. 1).

Другой типовой формат включает гетеродимерное мультиспецифическое антитело, которое включает первую тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина. Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc (шарнир-CH2-CH3) домен, слитый либо с помощью линкера, либо с помощью шарнирной области антитела с одноцепочечным Fv (scFv), который связывается с NKG2D. Разнообразные линкеры могут быть использованы для связывания scFv с первым Fc-доменом или внутри самого scFv. Кроме того, scFv может включать мутации, которые делают возможным образование дисульфидной связи для стабилизации общей структуры scFv. ScFv также может включать мутации для модификации изоэлектрической точки всей первой тяжелой цепи иммуноглобулина и/или для обеспечения более легкой последующей очистки. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc (шарнир-CH2-CH3) домен и второй варибельный домен тяжелой цепи, и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1. Легкая цепь иммуноглобулина включает варибельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина соединяется с легкой цепью иммуноглобулина и связывается с опухолевым антигеном. Первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (фиг. 2).

Альтернативный формат гетеродимерных мультиспецифических белков включает первую тяжелую цепь иммуноглобулина, вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, первую легкую цепь иммуноглобулина и вторую легкую цепь иммуноглобулина. Первая тяжелая цепь иммуноглобулина включает первый Fc (шарнир-CH2-CH3) домен, первый варибельный домен тяжелой цепи и необязательный первый домен тяжелой цепи CH1. Первая легкая цепь иммуноглобулина включает варибельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вместе с первой тяжелой цепью иммуноглобулина первая легкая цепь иммуноглобулина образует антигенсвязывающий участок, связывающий опухолевый антиген. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина включает второй Fc (шарнир-CH2-CH3) домен, второй варибельный домен тяжелой цепи и необязательно второй домен тяжелой цепи CH1. Вторая легкая цепь иммуноглобулина включает варибельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вместе со второй тяжелой цепью иммуноглобулина легкая цепь иммуноглобулина образует антигенсвязывающий участок, связывающийся с тем же опухолевым антигеном. Вторая тяжелая цепь иммуноглобулина может соединиться с легкой цепью иммуноглобулина, которая может быть идентична легкой цепи иммуноглобулина, которая соединяется с первой тяжелой цепью иммуноглобулина, за исключением того, что когда легкая цепь иммуноглобулина соединяется со второй тяжелой цепью иммуноглобулина, причем полученный антигенсвязывающий участок является вторым антигенсвязывающим участком, который связывается с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен и второй Fc-домен вместе могут связываться с CD16 (фиг. 1).

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

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме триомаба, который представляет собой трифункциональное биспецифическое антитело, которое поддерживает IgG-подобную форму. Эта химера состоит из двух полуантител, каждое с одной легкой и одной тяжелой цепью, которые происходят от двух родительских антител.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок представляет собой форму общей легкой цепи (LC), в которой используется технология "выступы-во-впадины" (KIH). KIH включает конструирование доменов CH3 для создания "выступа" или "впадины" в каждой тяжелой цепи для содействия гетеродимеризации. Концепция технологии Fc "выступы-во-впадины (KIH)" заключалась в том, чтобы ввести "выступ" в одном домене CH3 (CH3A) путем замены небольшого остатка на объемный (то есть, T366W<sub>CH3A</sub> в нумерации ЕС). Чтобы приспособить "выступ", на другом домене CH3 (CH3B) была создана дополнительная "впадина" поверхности путем замены ближайших соседних остатков к выступу более мелкими (т.е., T366S/L368A/Y407V<sub>CH3B</sub>). Мутация "впадина" была оптимизирована путем скрининга структурно-управляемой фаговой библиотеки (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* (1997) 270(1):26-35). Рентгеновские кристаллические структуры KIH Fc вариантов (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, et al., Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J Mol Biol* (2014) 426(9): 1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for Fcγ<sub>1</sub>R. *Mol Immunol* (2014) 58(1): 132-8) продемонстрировали, что гетеродимеризация термодинамически поддерживается гидрофобными взаимодействиями, обусловленными стерической комплементарностью на границе между ядром домена CH3 и внутренней поверхностью, тогда как поверхности выступ-выступ и впадина-впадина не благоприятствуют гомодимеризации вследствие стерического затруднения и нарушения благоприятных взаимодействий, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig<sup>TM</sup>), которые объединяют домены связывания мишеней двух моноклональных антител через гибкие природные линкеры и дает четырехвалентную IgG-подобную молекулу.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме ортогональной поверхности Fab (орто-Fab). В подходе к орто-Fab IgG (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, et al. Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2): 191-8), региональный дизайн на основе структуры вводит комплементарные мутации в поверхность LC и HC<sub>VH-CH1</sub> только в одном Fab, без каких-либо изменений в другом Fab.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок имеет формат "2 в 1 Ig". В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме ES, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab-фрагмента, связывающихся с мишенью 1 и мишенью 2, слитых с Fc. Гетеродимеризация обеспечивается электростатической мутацией в Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме κλ-тела, которая представляет собой гетеродимерные конструкции с 2 различными Fab, слитыми с Fc, стабилизированными мутациями гетеродимеризации: Fab1, нацеленный на антиген 1, содержит каппа-LC, тогда как второй Fab, нацеленный на антиген 2, содержит лямбда LC. На фиг. 13A представлено типовое представление одной формы κλ-тела. На фиг. 13B представлено типовое представление другого κλ-тела.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме обмена Fab-фрагментами (антитела, которые обмениваются Fab-фрагментами путем замены тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи (полумолекулы) на пару тяжелых-легких цепей из другой молекулы, что приводит к биспецифическим антителам). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме тела SEED (домен, сконструированный путем обмена между цепями (SEED) была разработана для генерирования асимметричных и биспецифических антителоподобных молекул, что позволяет расширять терапевтические применения естественных антител. Данная платформа, полученная с помощью белковой инженерии, основана на обмене структурно родственных последовательностей иммуноглобулина в консервативных доменах CH3. Конструкция SEED позволяет эффективно генерировать гетеродимеры AG/GA, в то же время препятствуя гомодимеризации доменов AG и GA SEED CH3. (Muda M. et al., *Protein Eng. Des. Sel.* (2011), 24(5):447-54)). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме LuZ-Y, в кото-

рой лейциновая "молния" используется для индуцирования гетеродимеризации двух разных HC. (Wranik, B.J. et al., J. Biol. Chem. (2012), 287:43331-9).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Cov-X-Body (В биспецифических CovX-антителах два разных пептида соединяются вместе с использованием разветвленного азетидинового линкера и сливаются с каркасным антителом в мягких условиях сайт-специфическим образом. В то время как фармакофоры отвечают за функциональную активность, каркас антител обеспечивает длительный период полураспада и Ig-подобное распределение. Фармакофоры могут быть химически оптимизированы или заменены другими фармакофорами для получения оптимизированных или уникальных биспецифических антител. (Doppalapudi VR et al., PNAS (2010), 107(52);22611-22616).

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в гетеродимерной форме Oasc-Fab, которая включает Fab, связывающийся с мишенью 1, и scFab, связывающийся с мишенью 2, слитые с F<sub>C</sub>. Гетеродимеризация обеспечивается мутациями в F<sub>C</sub>.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме DuetMab, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию, содержащую 2 разных Fab, связывающихся с антигеном 1 и 2, и F<sub>C</sub>, стабилизированные мутациями гетеродимеризации. Fab 1 и 2 содержат дифференциальные S-S мостики, которые обеспечивают правильное сопряжение LC и HC.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме CrossmAb, которая представляет собой гетеродимерную конструкцию с 2 различными Fab, связывающимися с мишенью 1 и 2, слитыми с F<sub>C</sub>, стабилизированными гетеродимеризацией. Домены CL и CH1 и домены VH и VL поменяны местами, например, CH1 соединен с VL, в то время как CL соединен с VH.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок находится в форме Fit-Ig, которая представляет собой гомодимерные конструкции, где Fab, связывающийся с антигеном 2, слит с N-концом HC Fab, который связывается с антигеном 1. Конструкция содержит F<sub>C</sub> дикого типа.

В табл. 1 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с NKG2D. Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в табл. 1, определяют по Кабат.

Таблица 1

Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPDFATYYCQQYN SYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDFATYYCQQ YHSFYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDFATYYCQQ SNSYYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARAR	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPDFATYYCQQYN

	GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)	SYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RTSQSISSYLNWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPRFSGSGSG TDFLTISLQPEDSATYYCQQS YDIPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASLESVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDFATYYCQQYG SFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASLESVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPDFATYYCQQSK EVPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASLESVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDFATYYCQQYN SFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASLESVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDFATYYCQQ YDIYPTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASLESVPSRFSGSGSGT

	NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:21)	EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYD SYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYQ SFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYQ SFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYS SFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYE SYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYD SFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC RASQSISWLAWEYQQKPGKAPK

	EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:33)	LLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDDFATYYCQQYQ SYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDFATYYCQQ YHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSIGSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDFATYYCQQ YELYSYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDDFATYYCQQYD TFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWM GGHPIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGD SSIRHAYYYYGMDVWGQGTITVTVS S (SEQ ID NO:41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVDP RFSGSGSGTDFLTISLQAEDV AVYYCQQYYSTPITFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:42)
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPLVKPSETLSLCTVSG GSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDR FHPYFDYWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:43)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSRYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSG TDFLTISLLEPEDFAVYYCQQF DTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:44)

ADI-27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD GGYYDSGAGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:45) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:51) - FTFSSYAMS или CDR1 (SEQ ID NO:90) - SYAMS CDR2 (SEQ ID NO:52) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:53) - AKDGGYYDSGAGDY или CDR3 (SEQ ID NO:91) - DGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC RASQGIDSWLAWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:46) CDR1 (SEQ ID NO:54) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:55) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:56) - QQGVSYPRT
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NSI.YLQMNSI.RAEDTAVYYCARGA PMGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:47) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:59) - ARGAPMGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:93) - GAPMGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC RASQGISSWLAWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSIQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEW MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMT RDTISSTAYMELSRLLSDDTAVYYC ARDTGEYYDTHGMDVWGQGT TVSS	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYCQDD YWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50)

	(SEQ ID NO:49) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:63) - YFTFGYYMH или CDR1 (SEQ ID NO:94) - GYYMH CDR2 (SEQ ID NO:64) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:65) - ARDTGEYYDTDDHGMDV или CDR3 (SEQ ID NO:95) - DTGEYYDTDDHGMDV	CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QQDDYWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWQGGLTLTVSS (SEQ ID NO:78)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC RASQSISSWLAWYQQKPKGKAPK LLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLPDDEFATYYCEQYD SYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:79)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRG RKASGSFYFYYGMDVWGQGTITV VSS (SEQ ID NO:80)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC ESSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKPLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQNDYSYPYTFGGQTKLEI K (SEQ ID NO:81)
A49MQ	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PQGAAAGWFDPPWQGGLTLTVSS (SEQ ID NO:96) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVK CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:97) -	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC RASQGISSWLAWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLPDEFATYYCQQ GVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT

	ARGAPQGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:98) - GAPQGAAAGWFDP	
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PQGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:99) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVKQ CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:100) - ARGAPQGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:101) - GAPQGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTC RASQGISSWLAWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PIGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVKQ CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:103) - ARGAPIGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:104) - GAPIGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTC RASQGISSWLAWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTC RASQGISSWLAWYQQKPKGKAP

	SSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PEGAAAGWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:105) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:106) - ARGAPEGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:107) - GAPEGAAAGWFDP	KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
A49MV	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLRLS <sup>CAAS</sup> GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PVGAAAGWFDPWGQGTI.VTVSS (SEQ ID NO:108) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTFSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:109) - ARGAPV <sup>G</sup> GAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:110) - GAPV <sup>G</sup> GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGD <sup>RVTITC</sup> RASQGISSWLA <sup>WYQKPGKAP</sup> KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
A49- консенсу ная	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLRLS <sup>CAAS</sup> GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PXGAAAGWFDPWGQGLTVTVSS, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F	DIQMTQSPSSVSASVGD <sup>RVTITC</sup> RASQGISSWLA <sup>WYQKPGKAP</sup> KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:60) -

	(SEQ ID NO:111) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:57) - FTSSYSMN или CDR1 (SEQ ID NO:92) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:58) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:112) - ARGAPXGAAAGWFDP или CDR3 (SEQ ID NO:113) - GAPXGAAAGWFDP, где X представляет собой M, L, I, V, Q или F	RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:61) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:62) - QQGVSPRT
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYFTFSYYMHWVRQAPGGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA REGAGFAYGMDYYMDVWGKGT VTVSS (SEQ ID NO:114) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:116) - YFTFSYYMH или CDR1 (SEQ ID NO:122) - SYMH CDR2 (SEQ ID NO:117) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:118) - AREGAGFAYGMDYYMDV или CDR3 (SEQ ID NO:123) - EGAGFAYGMDYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGGT DFTLTISLPEPDAVYYCQQSD NWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:115) CDR1 (SEQ ID NO:119) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:120) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:121) - QQSDNWPFT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYFTFSYYMHWVRQAPGGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA RGAPNYGDTTHDYYMDVWGKGT TVTSS (SEQ ID NO:124) CDR1 не по Кабат (SEQ ID NO:116) -	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDAVYYCQQ YDDWPFYGGGKVEIK (SEQ ID NO:125) CDR1 (SEQ ID NO:127) - RASQSVSSNLA
	YFTFSYYMH или CDR1 (SEQ ID NO:122) - SYMH CDR2 (SEQ ID NO:117) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 не по Кабат (SEQ ID NO:126) - ARGAPNYGDTTHDYYMDV или CDR3 (SEQ ID NO:130) - GAPNYGDTTHDYYMDV	CDR2 (SEQ ID NO:128) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:129) - QQYDDWPFT

Альтернативно, варибельный домен тяжелой цепи, определенный (SEQ ID NO: 69, может быть соединен с варибельным доменом легкой цепи, определенным (SEQ ID NO: 70, с образованием антиген-связывающего участка, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 9273136.

SEQ ID NO: 69

QVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKY-YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 70

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDILLPSGVS-DRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDAVYYCAAWDDSLNPGVFGGKTLTVL

Альтернативно, варибельный домен тяжелой цепи, определенный (SEQ ID NO: 71, может быть соединен с варибельным доменом легкой цепи, определенным (SEQ ID NO: 72, с образованием антиген-связывающего участка, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 7879985.

SEQ ID NO:71

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDISSYWWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS  
ANYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 72

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP-

DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

В Fc-домене связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2. Например, в IgG1 человека взаимодействие с CD16 главным образом сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамина в домене CH2 (см., Sondermann et al, Nature, 406(6793):267-273). На основе известных доменов мутации могут быть выбраны для усиления или уменьшения аффинности связывания с CD16, например, с использованием библиотек фагового дисплея или кДНК библиотек поверхностного дисплея дрожжей, или могут быть сконструированы на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

Сборка тяжелых цепей гетеродимерных антител может быть осуществлена путем экспрессии двух разных последовательностей тяжелых цепей антител в одной и той же клетке, что может привести к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также сборке гетеродимеров. Содействие преимущественной сборке гетеродимеров может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен CH3 каждой константной области тяжелой цепи антитела, как показано в US 13/494870, US 16/028850, US 11/533709, US 12/875015, US 13/289934, US 14/773418, US 12/811207, US 13/866756, US 14/647480, US 14/830336. Например, мутации могут быть проведены в домене CH3 на основе IgG1 человека и включают различные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, которые позволяют этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Все положения аминокислотных замен, показанные ниже, пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Кабат.

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

Вариабельный домен тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению может необязательно сочетаться с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнирные, домены CH2 и CH3 с или без домена CH1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела человека, такой как константная область IgG1 человека, константная область IgG2 человека, константная область IgG3 человека или константная область IgG4 человека. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью IgG1 человека, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Типовые замены включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области IgG1 человека, могут находиться в положении аминокислот V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В некоторых вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в C $\alpha$  константной области IgG1 человека, могут находиться в положении аминокислот E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в табл. 2.

Таблица 2

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, приведенных в табл. 3.

Таблица 3

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	K409W	D399V/F405T
Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, показанных в табл. 4.

Таблица 4

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Набор 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Набор 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Набор 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Набор 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Набор 6	E356K/D399K	K392D/K409D

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из табл. 5.

Таблица 5

Первый полипептид	Второй полипептид
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

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

Таблица 6

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

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в табл. 7, где аминокислота в положении(ях), указанном в столбце "Первый полипептид", заменена любой известной положительно заряженной аминокислотой, и аминокислота в указанном положе-

нии(ях) в столбце "Второй полипептид", заменена любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 7

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

Альтернативно или в дополнение, структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть повышена путем введения S354C на первой или второй полипептидной цепи и Y349C на противоположной полипептидной цепи, которая образует искусственный дисульфидный мостик на границе раздела двух полипептидов.

Мультиспецифические белки, описанные выше, могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в третий вектор экспрессии; первый, второй и третий векторы экспрессии могут быть вместо стабильно трансфицированы в клетки-хозяева для получения мультимерных белков.

Для достижения наибольшего выхода мультиспецифического белка можно изучить различные соотношения первого, второго и третьего вектора экспрессии, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для генерации банка клеток с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ограниченное разведение, ИФА, FACS, микроскопия или Clonperix.

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

## II. Характеристики TriNKET

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе TriNKET, которые включают NKG2D-связывающий домен и связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена, связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D человека. В некоторых вариантах осуществления TriNKET, которые включают NKG2D-связывающий домен и связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена, связываются с опухоль-ассоциированным антигеном на уровне, сопоставимом с моноклональным антителом, имеющим тот же опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен. Например, TriNKET, которые включают

NKG2D-связывающий домен и HER2-связывающий домен из трастузумаба, могут связываться с HER2, экспрессируемым на клетках, на уровне, сопоставимом с таковым у трастузумаба.

Однако описанные в данном документе TriNKET более эффективны в снижении роста опухоли и уничтожении раковых клеток. Например, TriNKET по настоящему изобретению, который нацелен на HER2-экспрессирующий опухоль-ассоциированный антиген, более эффективен, чем SC2.2 - одноцепочечная биспецифическая молекула, построенная из scFv, полученного из трастузумаба, связанного с ULBP-6, лигандом для NKG2D. SC2.2 связывает раковые клетки HER2+ и NKG2D+ NK-клетки одновременно. Поэтому была исследована эффективность SC2.2 в снижении количества раковых клеток HER2+. Анализ активации и цитотоксичности *in vitro* показали, что SC2.2 эффективен в активации и уничтожении NK-клеток. Однако SC2.2 не смог продемонстрировать эффективность в модели подкожной опухоли RMA/S-HER2. Эффективность SC2.2 также тестировали *in vivo* с использованием модели сингенной мыши со сверхэкспрессирующей RMA/S-HER2. В этой мышинной модели SC2.2 не смог продемонстрировать контроль роста опухоли по сравнению с контролем носителя. Таким образом, хотя SC2.2 был способен активировать и убивать NK-клетки, и связываться с раковыми клетками HER2+, эти свойства были недостаточны для эффективного контроля роста опухоли HER2+.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе TriNKET, которые включают NKG2D-связывающий домен и связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена активируют первичные NK-клетки человека при культивировании с опухоль-ассоциированными антигенами. Активация NK-клеток отмечена увеличением дегрануляции CD107a и продуцированием цитокинов IFN $\gamma$ . Кроме того, по сравнению с моноклональным антителом, которое включает опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен, TriNKET демонстрируют превосходную активацию NK-клеток человека в присутствии опухоль-ассоциированных антигенов. Например, по сравнению с моноклональным антителом трастузумабом, TriNKET по настоящему изобретению, имеющие HER2-связывающий домен, обладают превосходной активацией NK-клеток человека в присутствии HER2-экспрессирующих раковых клеток.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе TriNKET, которые включают NKG2D-связывающий домен и связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена, усиливают активность покоящихся и активированных IL-2 NK-клеток человека в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих антиген. NK-клетки в покое показали меньшее фоновое продуцирование IFN $\gamma$  и дегрануляцию CD107a, чем NK-клетки, активированные IL-2. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки, активированные IL-2, показывают больший процент клеток, становящихся IFN $\gamma$ +; CD107a+ после стимуляции TriNKET.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе TriNKET, которые включают NKG2D-связывающий домен и связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), усиливают цитотоксическую активность покоящихся и IL-2-активированных NK-клеток человека в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих антиген. Кроме того, TriNKET (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), более эффективно направляют ответы активированных и покоящихся NK-клеток против опухолевых клеток по сравнению с моноклональным антителом, которое включает тот же участок связывания опухоль-ассоциированного антигена. В некоторых вариантах осуществления TriNKET обладают преимуществом в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих средние и низкие опухолевые антигены, по сравнению с моноклональными антителами, которые включают один и тот же участок связывания опухоль-ассоциированного антигена. Следовательно, терапия, включающая TriNKET, может быть лучше терапии моноклональными антителами. Во всех этих условиях TriNKET индуцировали большую активацию NK-клеток и большее уничтожение опухолевых клеток, когда NK-клетки инкубировали с IL-2 по сравнению с NK-клетками без IL-2, демонстрируя синергизм между TriNKET и IL-2.

В определенных вариантах осуществления, по сравнению с моноклональными антителами, TriNKET, описанные в данном документе (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), полезны при лечении рака с высокой экспрессией Fc-рецептора (FcR) или рака, находящегося в микроокружении опухоли с высокими уровнями FcR. Моноклональные антитела оказывают свое влияние на рост опухоли посредством множества механизмов, включая АЗКЦ (ADCC), CDC (комплементзависимую цитотоксичность), фагоцитоз и сигнальную блокаду среди прочих. Среди Fc $\gamma$ R CD16 имеет самое низкое сродство к Fc IgG; Fc $\gamma$ RI (CD64) представляет собой высокоаффинный FcR, который примерно в 1000 раз сильнее связывается с Fc IgG, чем CD16. CD64 обычно экспрессируется на многих гематопоэтических линиях, таких как миелоидная линия, и может экспрессироваться на опухолях, происходящих из этих типов клеток, таких как острая миелоидная лейкемия (ОМЛ). Иммунные клетки, проникающие в опухоль, такие как MDSC и моноциты, также экспрессируют CD64 и, как известно, проникают в микроокружение опухоли. Экспрессия CD64 опухолью или в микроокружении опухоли может оказывать негативное воздействие на терапию моноклональными антителами. Экспрессия CD64 в микроокружении опухоли затрудняет взаимодействие этих антител с CD16 на поверхности NK-клеток, поскольку антитела предпочитают связывать высокоаффинный рецептор. TriNKET, воздействуя на два активирующих рецептора на поверхности NK-клеток, могут преодолеть пагубное влияние экспрессии CD64 (либо на опухоль, либо на микроокружение опухоли) на терапию моноклональными антителами. Независимо от экспрессии CD64 на опухолевых клетках, TriNKET способны опосредовать ответы NK-клеток человека против всех опухолевых клеток, поскольку двойное нацеливание двух активирующих рецепторов на NK-клетки обеспечивает более сильное специфическое связывание с NK-клетками.

В некоторых вариантах осуществления TriNKET, описанные в настоящем документе (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают домен связывания для опухоль-ассоциированных антигенов (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2) обеспечивают лучший профиль безопасности посредством уменьшения побочных эффектов, вызванных связыванием с мишенью вне опухоли. Естественные клетки-киллеры и CD8 Т-клетки способны непосредственно лизировать опухолевые клетки, хотя механизмы, посредством которых NK-клетки и CD8 Т-клетки распознают нормальные клетки от опухолевых клеток, отличаются. Активность NK-клеток регулируется балансом сигналов от активирующих (NCR, NKG2D, CD16 и т.д.) и ингибирующих (KIR, NKG2A и т.д.) рецепторов. Баланс этих активирующих и ингибирующих сигналов позволяет NK-клеткам определять здоровые аутоклетки из стрессированных, инфицированных вирусом или трансформированных аутоклеток. Этот "врожденный" механизм аутоотолерантности поможет защитить нормальную здоровую ткань от ответов NK-клеток. Чтобы расширить этот принцип, аутоотолерантность NK-клеток позволит TriNKET нацеливать на антигены, экспрессируемые как на поверхности аутоклеток, так и на поверхности опухо-

ли, без побочных эффектов или с увеличенным терапевтическим окном. В отличие от естественных клеток-киллеров, Т-клеткам требуется распознавание специфического пептида, представленного молекулами МНС для активации и эффекторных функций. Т-клетки были основной целью иммунотерапии, и было разработано много стратегий для перенаправления Т-клеточных ответов против опухоли. Биспецифические Т-клетки, ингибиторы контрольных точек и CAR-Т-клетки были одобрены FDA, но часто оказывают дозозимитирующее токсическое действие. Биспецифические Т-клетки и CAR-Т-клетки работают вокруг системы распознавания TCR-МНС, используя связывающие домены для нацеливания антигенов на поверхность опухолевых клеток и используя сконструированные сигнальные домены для передачи сигналов активации в эффекторную клетку. Несмотря на то, что эти способы лечения эффективны для выявления противоопухолевого иммунного ответа, они часто сочетаются с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) и побочными эффектами, вызванными связыванием с мишенью вне опухоли. TriNKET уникальны в этом контексте, поскольку они не будут "перекрывать" естественные системы активации и ингибирования NK-клеток. Вместо этого TriNKET предназначены для изменения баланса и обеспечения дополнительных сигналов активации для NK-клеток, сохраняя при этом толерантность NK к здоровым аутоклеткам.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе TriNKET, включающие NKG2D-связывающий домен (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают связывающий домен опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), более эффективно задерживают прогрессирование опухоли, чем моноклональные антитела, которые включают тот же самый опухолевый антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления TriNKET, содержащие NKG2D-связывающий домен и опухолевый антигенсвязывающий домен, более эффективны против метастазов рака, чем моноклональные антитела, которые включают один и тот же опухолевый антигенсвязывающий домен.

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

### III. Применения в терапевтических целях

В настоящем изобретении приводятся способы лечения рака с использованием описанного в настоящем документе мультиспецифического связывающего белка (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), который включает связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), и/или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. Способы могут быть использованы для лечения различных видов рака, включая солидную опухоль, лимфому и лейкоз. Тип рака, подлежащий лечению, желателен соответствует типу раковой клетки, с которой связывается мультиспецифический связывающий белок. Например, лечение рака, экспрессирующего адгезивную молекулу эпителиальных клеток (EpCAM), такого как рак толстой кишки, экспрессирующей EpCAM, желателен лечить с использованием описанного в настоящем документе мультиспецифического связывающего белка, который связывается с NKG2D, CD16 и EpCAM. Дополнительные аспекты и варианты осуществления терапевтических способов описаны ниже.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения обеспечивает способ лечения рака у пациента, причем способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем документе (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов, включая CD20, BCMA и HER2), для лечения рака. Примеры рака для лечения включают солидную опухоль, лейкоз и лимфому.

Терапевтический способ может быть охарактеризован в зависимости от рака, подлежащего лечению. Например, в определенных вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой рак мозга, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легкого, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак прямой кишки, рак почки, рак желудка, рак яичка или рак матки. В других вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточный рак, аденокарциному, мелкоклеточный рак, меланому, глиому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидно-кистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анальной части прямой кишки, рак анального канала, рак прямой кишки, астроцитарной опухоли, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак костей, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхиальной железы, нейроэндокринные

опухоли, холангиокарциному, хондросаркому, папиллому/карциному сосудистой оболочки, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, эндодермальную опухоль, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому матки, эндометриоидную аденокарциному, рак эндотелиоцитов, эпидимальный рак, рак эпителиальных клеток, саркому Юинга, рак глаз и глазницы, рак женских половых органов, фокальную нодулярную гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак свода желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластому, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденому печени, печеночный аденоматоз, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интраэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутривенного желчного протока, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак сустава, саркому Капоши, рак таза, крупноклеточный рак, рак толстой кишки, лейомиосаркому, меланому лентиго, лимфому, рак половых органов у мужчин, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак ротовой полости, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному узелковую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, мелкоклеточный рак, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркома, папиллярная серозная аденокарцинома, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, бластому легкого, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозный рак, рак пазухи, рак кожи, мелкоклеточный рак, рак тонкой кишки, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточный рак, поперечно-полосатый рак мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеочника, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочевой системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, ВИПому, рак вульвы, высокодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

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

Рак, подлежащий лечению, может быть охарактеризован в соответствии с наличием определенного антигена, экспрессируемого на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка экспрессирует одно или более из следующего: HER2, CD20, CD33, BCMA, EpCAM, CD2, CD19, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD-L1.

В определенных вариантах осуществления белок по настоящему изобретению используется в способе усиления гибели опухолевых клеток (синонимично с лизисом, уничтожением, абляцией, уменьшением выживаемости или пролиферации клеток, и т.п.) прямо или опосредованно, или для производства лекарственного средства для использования в способе усиления гибели опухолевых клеток (синонимично с лизисом, уничтожением, абляцией, снижением выживаемости или пролиферации клеток и т.п.) прямо или опосредованно, путем воздействия на опухолевые или раковые клетки и естественные клетки-киллеры белка по настоящему изобретению (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов включают CD20, BCMA и HER2). Опухолевая клетка, которая реагирует на белок, как описано выше, экспрессирует опухоль-ассоциированный антиген, с которым связывается второй антигенсвязывающий участок белка. Например, в типовом варианте осуществления C26-TriNKET-CD20 используется для нацеливания на экспрессирующую CD20 опухолевую или раковую клетку (либо покоящуюся, либо активированную); в другом типичном варианте осуществления C26-TriNKET-BCMA используется для нацеливания на BCMA-экспрессирующую опухоль или раковую клетку (либо покоящуюся, либо активированную).

В некоторых вариантах осуществления белок по настоящему изобретению используется в способе лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, или в производстве лекарственного средства для применения в способе лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту белок или состав, содержащий белок по настоящему изобретению (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), которые включают домен связывания для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов включают CD20, BCMA и HER2). Раковая клетка, реагирующая на белок, как описано выше, экспрессирует опухоль-ассоциированный антиген, с которым связывается второй антигенсвязывающий участок белка. Например, в типовом варианте осуществления C26-TriNKET-CD20 используется для нацеливания на экспрессирующую CD20 раковую клетку (либо покоящуюся, либо активированную); в другом типичном варианте осуществления C26-TriNKET-BCMA используется для нацеливания на BCMA-экспрессирующую раковую клетку (либо покоящуюся, либо активированную).

#### IV. Комбинированная терапия

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается комбинированная терапия. Мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем документе, используются в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака.

В одном аспекте изобретение относится к способу усиления гибели опухолевых клеток прямо или опосредованно, причем способ включает воздействие на опухоль и естественные клетки-киллеры белка, содержащего: (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывается CD16; в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из: блокатора контрольных точек; цитокина; агониста TLR; агониста STING; химиотерапевтического агента; агента, нацеленного на рак, который взаимодействует со специфическими молекулами в раковых клетках, которые участвуют в росте или выживании раковых клеток, включая, например, ингибиторы киназы, такие как ибрутиниб, вемурафениб или гливек; онколитического вируса; вакцины; радиации; адоптивной терапии НК, которая включает инфузию размноженных *ex vivo* НК-клеток или Т-клеток, включая клетки, которые были модифицированы *in vitro* для экспрессии химерного антигенного рецептора (например, CAR-Т клетки); и трансплантации стволовых клеток (SCT).

В определенных вариантах осуществления второй терапевтический агент содержит CAR-Т клетку. Технология CAR-Т известна в данной области техники и описана в патенте США № 10174095, публикации заявки на патент США № 2015/0283178 и рассмотрена в Guedan et al., *Mol Ther Methods Clin Dev.* (2018) 12:145-156. CAR могут нацеливаться на множество антигенов. Например, в определенных вариантах осуществления CAR-Т-клетка экспрессирует или способна экспрессировать CAR, который специфически связывается с опухоль-ассоциированным антигеном, например, CD19, CD22, BCMA, PSMA, мезотелином (MSLN), ROR1, WT1, L1CAM, MUC16 или LeY. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированный антиген, связанный CAR, представляет собой тот же самый антиген, связанный вторым антигенсвязывающим участком мультиспецифического связывающего белка. В определенных вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий участок, который является таким же или по существу таким же, как второй антигенсвязывающий участок мультиспецифического связывающего белка.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего: (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16; или состав, содержащий белок; в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек; цитокина; агониста TLR; агониста STING; химиотерапевтического агента; агента, нацеленного на рак, который взаимодействует со специфическими молекулами в раковых клетках, которые участвуют в росте или выживании раковых клеток, включая, например, ингибиторы киназы, такие как ибрутиниб, вемурафениб или гливек; онколитического вируса; вакцины; радиации; адоптивной терапии НК, которая включает инфузию размноженных *ex vivo* НК-клеток или Т-клеток, включая клетки, которые были модифицированы *in vitro* для экспрессии химерного антигенного рецептора (например, CAR-Т-клетки); и трансплантации стволовых клеток (SCT).

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с блокатором контрольных точек, выбранным из: антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к KIR, антитела к NKG2A, антитела к LAG3 и антитела к TIM3.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с цитокином, включая интерфероны и интерлейкины, такие как IL-2, IL-15, IL-12, INF $\alpha$ , IL-21, PEG-IL-2 (модифицированный полиэтиленгликолем интерлейкин-2) и гетеродимеры IL15/IL15R.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агонистом TLR, выбранным из агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR7/8, агониста TLR9, агониста TLR4 и агониста TLR3.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агонистом STING ADU-S100.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с химиотерапевтическим агентом, включающим алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид, мехлорэтамин, хлорамбуцил, мелфалан, дакарбазин (DTIC), нитрозомочевины, темозоломид (пероральный дакарбазин); антрациклины, такие как даунорубин, доксорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон и валрубин; разрушители цитоскелета, такие как паклитаксел, наб-паклитаксел, доцетаксел, абраксан и таксотер; эпитилоны; ингибиторы гистондеацетилазы, такие как вориностат и ромидепсин; ингибиторы топоизомеразы I, такие как иринотекан и топотекан; ингибиторы топоизомеразы II, такие как этопозид, тенипозид и тафлупозид; ингибиторы киназы, такие как бортезомиб, эрлотиниб, гефитиниб, иматиниб, вемурафениб и висмодегиб; аналоги нуклеотидов и аналоги-предшественники, такие как азацитидин, азатиоприн, капецитабин; пептидные антибиотики, такие как блеомицин и актиномицин; агенты на основе платины, такие как карбоплатин, цисплатин и оксалиплатин; ретиноиды, такие как третиноин и алитретиноин; и алкалоиды барвинка и их производные, такие как винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с блокаторм контрольных точек, выбранным из: ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, ипилимумаба, тремелиумаба, лирилумаба и монализумаба.

В настоящем изобретении предлагается способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агонистом TLR, выбранным из: R848/резиквимода, VTX-2337, имиквимода и CpG-олигодезоксинуклеотида.

В настоящем изобретении предложен способ прямого или опосредованного усиления гибели опухолевых клеток и/или способ лечения рака белком, содержащим: (а) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и (с) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий участок, который связывает CD16, в комбинации с агентом, который индуцирует клеточное старение. Агент, индуцирующий старение раковых клеток, тем самым повышая чувствительность клеток к уничтожению и/или клиренсу иммунными клетками (например, НК-клетками). Клеточное старение может быть индуцировано рядом клеточных событий, таких как остановка клеточного цикла, повреждение ДНК и ингибирование каскада митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Агенты, которые вызывают клеточное старение, известны в данной области техники и описаны, например, в Ruscetti et al., Science (2018) 362, 1416-22; and Herranz et al., J. Clin. Invest. (2018) 128(4): 1238-1246. В некоторых вариантах осуществления агент, который индуцирует клеточное старение,

включает комбинацию агента, который индуцирует терминацию клеточного цикла, такого как ингибитор циклинзависимой киназы (CDK), и ингибитор MAPK-киназы (МЕК). В некоторых вариантах осуществления агент, который индуцирует клеточное старение, содержит комбинацию ингибитора CDK4/6 (например, палбоциклиба, абемакиклиба или рибоциклиба) и ингибитора МЕК1/2 (например, траметиниба, кобиметиниба, рефаметиниба или селуметиниба).

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

Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического агента, и относительные сроки введения могут быть выбраны для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при назначении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации или фармацевтическую композицию, или композиции, содержащие терапевтические агенты, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, одновременно, вместе, одновременно и тому подобное. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить в то время, когда дополнительный терапевтический агент(ы) оказывает свое проолактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

#### V. Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в настоящем документе (например, A40-TriNKET, A44-TriNKET, A49-TriNKET, C26-TriNKET, F04-TriNKET, F43-TriNKET, F47-TriNKET и F63-TriNKET), который включает связывающий домен для опухоль-ассоциированного антигена (неограничивающие примеры опухоль-ассоциированных антигенов включают CD20, BCMA и HER2). Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарственного средства. Один или более физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей также могут быть включены в композицию для надлежащего приготовления. Подходящие составы для использования в настоящем раскрытии найдены в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарственных средств см., например, Langer (Science 249: 1527-1533, 1990).

Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, ручке или шприце. В определенных вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой лиофилизированный состав или жидкий состав. В определенных вариантах осуществления состав может быть высушен вымораживанием (лиофилизирован) и содержаться в около 12-60 флаконах. В некоторых вариантах состав может быть лиофилизирован, и 45 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В определенных вариантах осуществления около 40-100 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка во внутривенном лекарственном препарате. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве от около 250 мг/флакон до около 1000 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве около 600 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления состав может представлять собой жидкий состав и храниться в количестве около 250 мг/флакон.

Данное настоящее изобретение может существовать в жидком водном фармацевтическом составе, включающем терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав.

Данные композиции могут быть стерилизованы с помощью обычных способов стерилизации или могут быть стерильно отфильтрованы. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным носителем перед введением. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8 и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в несколько однодозовых емкостей, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для изменяемого количества.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается состав с увеличенным сроком хранения, включающая белок по настоящему изобретению, в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

В определенных вариантах осуществления готовят водный состав, включающий белок по настоящему изобретению в pH-буферном растворе. Буфер по данному изобретению может иметь pH в диапазоне от около 4 до около 8, например от около 4,5 до около 6,0 или от около 4,8 до около 5,5 или может иметь pH от около 5,0 до около 5,2. Диапазоны, промежуточные по отношению к указанным выше значениям pH, также должны быть частью этого раскрытия. Например, диапазоны значений, использующие комбинацию любого из приведенных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов, пред-

назначены для включения. Примеры буферов, которые будут регулировать рН в этом диапазоне, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот.

В определенных вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания рН в диапазоне от около 4 до около 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон рН может составлять от около 4,5 до около 6,0 или от около 4,8 до около 5,5, или диапазон рН от около 5,0 до около 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, фосфат динатрия дигидрат и/или дигидрофосфат натрия дигидрат. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает около 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), около 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), около 1,5 мг/мл фосфата динатрий дигидрата (например, 1,53 мг/мл), около 0,9 мг/мл дигидрофосфата натрия дигидрата (например, 0,86) и около 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, от 0,25 до 0,5 мг/мл цитрата натрия, от 1,25 до 1,75 мг/мл динатрия фосфата дигидрата, от 0,7 до 1,1 мг/мл натрия дигидрофосфата дигидрата и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления рН состав корректируют с помощью гидроксида натрия.

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

Также могут быть добавлены в состав детергент или поверхностно-активное вещество. Типовые детергенты включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно уменьшает агрегацию составленного антитела и/или сводит к минимуму образование частиц в составе, и/или уменьшает адсорбцию. В определенных вариантах осуществления состав может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Твин 80. Твин 80 представляет собой термин, используемый для описания полиоксиэтилена (20) сорбитанмоноолеата (см., Fiedler, *Lexikon der Hilfsstoffe*, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от около 0,1 до около 10 мг/мл полисорбата 80 или от около 0,5 до около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления около 0,1% полисорбата 80 может быть добавлено в состав.

В вариантах осуществления белковый продукт по настоящему изобретению составлен в виде жидком составе. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл во флаконе согласно фармакопее США/Ерв. Фарм. тип I 50R, закрытом резиновой пробкой и запечатанном алюминиевым обжимным колпачком. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего фармакопее США и Ерв. Фарм. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем 60 мл. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% солевым раствором.

В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром при стабилизирующих уровнях. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен на водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем того, которое может привести к вязкости, нежелательной или непригодной для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления сахар может быть дисахаридами, например, сахарозой. В определенных вариантах осуществления жидкий состав также может включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества и консерванта.

В некоторых вариантах осуществления рН жидкого состава может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой соляную кислоту. В определенных вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

В дополнение к агрегации, дезамидирование представляет собой распространенный вариант продукта пептидов и белков, который может происходить во время ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения действующего вещества/лекарственного продукта и во время анализа образца. Деза-

мидирование представляет собой потерю группы  $\text{NH}_2$  из белка, образующего промежуточный сукцинимид, который может подвергаться гидролизу. Промежуточный сукцинимид приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение промежуточного сукцинимиды затруднено из-за нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование обычно определяется как увеличение массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит к аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоте. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, находящиеся вблизи с Asn в пептидной цепи, влияют на скорости дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой восприимчивости к дезамидированию.

В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть сохранен в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

Представляющий интерес водный носитель в настоящем документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и полезным для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI - англ. "sterile water for injection"), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI - bacteriostatic water for injection), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

В составы необязательно может быть добавлен консервант для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчать производство многократного (многократного) состава.

Составы для внутривенного введения (ВВ) могут быть предпочтительным путем введения в конкретных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации, получая все лекарственные средства посредством ВВ введения. В некоторых вариантах осуществления перед введением жидкий состав разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления разбавленный лекарственный состав для инъекций является изотоническим и подходит для введения посредством внутривенной инфузии.

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

В составы необязательно может быть добавлен консервант для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчать производство многократного (многократного) состава.

Представляющий интерес водный носитель в настоящем документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и полезным для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Данное настоящее изобретение может существовать в лиофилизированном составе, включающем белки и лиопротектор. Лиопротектор может быть сахаром, например дисахаридами. В определенных вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также включать один или более из буферного агента, поверхностно-активного вещества, наполнителя и/или консерванта.

Количество сахарозы или мальтозы, пригодное для стабилизации лиофилизированного лекарственного средства, может быть в массовом соотношении по меньшей мере 1:2 белка к сахарозе или мальтозе. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белок/сахароза или мальтоза может составлять от 1:2 до 1:5.

В некоторых вариантах осуществления pH состава перед лиофилизацией может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может представлять собой хлористоводородную кислоту. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может быть гидроксид натрия.

Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, может быть отрегулировано в диапазоне от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного средства может составлять от 7 до 8.

В некоторых вариантах осуществления соли или буферные компоненты могут быть добавлены в количестве 10-200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и получены из раз-

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

В определенных вариантах осуществления может быть добавлен "наполнитель". "Наполнитель" представляет собой соединение, которое добавляет массу к лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (например, облегчает производство по существу однородной лиофилизированной массы, которая поддерживает открытопористую структуру). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лيوфилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

В составы необязательно может быть добавлен консервант для уменьшения бактериального действия. Добавление консерванта может, например, облегчать производство многоразового (многократного) состава.

В определенных вариантах осуществления лиофилизированное лекарственное средство может быть составлено с водным носителем. Представляющий интерес водный носитель в настоящем документе является фармацевтически приемлемым (например, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и полезным для приготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

В определенных вариантах осуществления лиофилизированное лекарственное средство по настоящему изобретению восстанавливают либо стерильной водой для инъекций, фармакопея США (USP) (SWFI), либо 0,9% инъекцией хлорида натрия, фармакопея США. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяют в растворе.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему изобретению восстанавливают до около 4,5 мл водой для инъекций и разбавляют 0,9% соевым раствором (раствор хлорида натрия).

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

Конкретная доза может представлять собой унифицированную дозу для каждого пациента, например, 50-5000 мг белка. Альтернативно, доза пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или патологическое состояние, которое нужно лечить или предупреждать, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Специалисты в данной области техники обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозировки для лечения, особенно в свете информации о дозировке и тестов, раскрытых в настоящем документе. Дозировка также может быть определена путем использования известных анализов для определения доз, используемых вместе с соответствующими данными доза-ответ. Дозировка индивидуального пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием заболевания. Уровни в крови целевой конструкции или комплекса у пациента могут быть измерены, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может быть использована для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы, и их дозировки, наиболее вероятно, будут эффективными для данного индивидуума (Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

В общем, дозировки, основанные на массе тела, находятся в пределах от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, например, от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 0,1 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от

около 50 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мг до около 100 мг/кг массы тела.

Дозы могут вводиться один или более раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно, или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторения для дозирования на основании измеренных времен пребывания и концентраций целевой конструкции или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, внутрисполостным, с помощью перфузий через катетер или с помощью прямой инъекции в очаг поражения. Это может осуществляться один или более раз в день, один или более раз в неделю, один или более раз в месяц и один или более раз в год.

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

### Примеры

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

Пример 1 - NKG2D-связывающие домены связываются с NKG2D

#### **NKG2D-связывающие домены связываются с очищенным рекомбинантным NKG2D**

Последовательности нуклеиновых кислот эктодоменов NKG2D человека, мыши или яванского макака были слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими Fc-домены IgG1 человека, и введены в клетки млекопитающих для экспрессии. После очистки белки слияния NKG2D-Fc адсорбировали в лунках микропланшетов. После блокирования лунок бычьим сывороточным альбумином для предотвращения неспецифического связывания NKG2D-связывающие домены титровали и добавляли в лунки, с предварительно адсорбированными белками слияния NKG2D-Fc. Связывание первичного антитела определяли с использованием вторичного антитела, которое конъюгировали с пероксидазой хрена и специфически распознавали легкую цепь каппа человека, чтобы избежать перекрестной реактивности с Fc. 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (ТМБ), субстрат для пероксидазы хрена, добавляли в лунки для визуализации сигнала связывания, у которого измеряли оптическую плотность при 450 нм и корректировали при 540 нм. Клон NKG2D-связывающего домена, контрольный изотип или положительный контроль (выбранный из (SEQ ID NO: 45-48 или клоны к мышиному NKG2D MI-6 и CX-5, доступные от eBioscience) добавляли в каждую лунку.

Контрольный изотип показал минимальное связывание с рекомбинантными белками NKG2D-Fc, в то время как положительный контроль наиболее сильно связывался с рекомбинантными антигенами. NKG2D-связывающие домены, вырабатываемые всеми клонами, демонстрировали связывание с рекомбинантными белками NKG2D-Fc человека, мыши и яванского макака, хотя с разным сродством от клона к клону. Как правило, каждый клон к NKG2D, связывается с рекомбинантным NKG2D-Fc человека (фиг. 14) и яванского макака (фиг. 15), со сходным сродством, но с более низким сродством с рекомбинантным NKG2D-Fc мыши (фиг. 16).

#### **NKG2D-связывающие домены связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D**

Линии клеток EL4 лимфомы мыши были сконструированы для экспрессии химерных антигенных рецепторов сигнального домена NKG2D-CD3-дзета человека или мыши. NKG2D-связывающий клон, контрольный изотип или положительный контроль использовали в концентрации 100 нМ для окрашивания внеклеточного NKG2D, экспрессированного на поверхности клеток EL4. Связывание антител определяли с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали соотношение сигнала по сравнению с фоном (FOB - "fold-over-background") с использованием среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) NKG2D-экспрессирующих клеток по сравнению с исходными клетками EL4.

NKG2D-связывающие домены, вырабатываемые всеми клонами, связывались с клетками EL4, экспрессирующими NKG2D человека и мыши. Антитела положительного контроля (выбранные из (SEQ ID NO: 45-48 или клоны к мышиному NKG2D MI-6 и CX-5, доступные от eBioscience) давали лучший сигнал связывания FOB. Аффинность связывания NKG2D для каждого клона была сходной между клетками, экспрессирующими NKG2D человека (фиг. 17) и мыши (фиг. 18).

Пример 2 -NKG2D-связывающие домены блокируют связывание природного лиганда с NKG2D

#### **Конкуренция с ULBP-6**

Рекомбинантные белки NKG2D-Fc человека адсорбировали в лунках микропланшета и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания. Насыщаю-

шую концентрацию ULBP-6-His-биотина добавляли в лунки с последующим добавлением клонов NKG2D-связывающих доменов. После 2-часовой инкубации лунки промывали и ULBP-6-His-биотин, который оставался связанным с лунками, покрытыми NKG2D-Fc, определяли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена, и субстратом ТМВ. Поглощение измеряли при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычитания фона специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белками NKG2D-Fc рассчитывали по проценту ULBP-6-His-биотина, который блокировался от связывания с белками NKG2D-Fc в лунках. Антитело положительного контроля (выбранное из SEQ ID NO: 45-48) и различные NKG2D-связывающие домены блокировали связывание ULBP-6 с NKG2D, в то время как контрольный изотип показал небольшую конкуренцию с ULBP-6 (фиг. 19).

#### **Конкуренция с MICA**

Рекомбинантные белки MICA-Fc человека адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания. NKG2D-Fc-биотин добавляли в лунки, после чего добавляли NKG2D-связывающие домены. После инкубации и промывания NKG2D-Fc-биотин, который оставался связанным с лунками, покрытыми MICA-Fc, детектировали с использованием стрептавидин-HRP и субстрата ТМВ. Поглощение измеряли при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычитания фона специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белками NKG2D-Fc рассчитывали по проценту NKG2D-Fc-биотина, который блокировался от связывания с белками MICA-Fc в лунках. Антитело положительного контроля (выбранное из SEQ ID NO: 45-48) и различные NKG2D-связывающие домены блокировали связывание MICA с NKG2D, в то время как контрольный изотип показал небольшую конкуренцию с MICA (фиг. 20).

#### **Конкуренция с Rae-1 дельта**

Рекомбинантный Rae-1 дельта-Fc мыши (приобретенный у R & D Systems) адсорбировали в лунках микропланшета, и лунки блокировали бычьим сывороточным альбумином для уменьшения неспецифического связывания. NKG2D-Fc-биотин мыши добавляли в лунки, после чего добавляли NKG2D-связывающие домены. После инкубации и промывания NKG2D-Fc-биотин, который оставался связанным с лунками, покрытыми Rae-1 дельта-Fc, детектировали с использованием стрептавидин-HRP и субстрата ТМВ. Поглощение измеряли при 450 нМ и корректировали при 540 нМ. После вычитания фона специфическое связывание NKG2D-связывающих доменов с белками NKG2D-Fc рассчитывали по проценту NKG2D-Fc-биотина, который блокировался от связывания с белками Rae-1 дельта-Fc в лунках. Положительный контроль (выбранный из SEQ ID NO: 45-48 или клонов к мышиному NKG2D MI-6 и CX-5, доступных от eBioscience) и различные клоны NKG2D-связывающего домена блокировали связывание Rae-1 дельта с NKG2D мыши, в то время как контрольный изотип антитела демонстрировал небольшую конкуренцию с Rae-1 дельта (фиг. 21).

Пример 3 - клоны NKG2D-связывающего домена активируют NKG2D

Последовательности нуклеиновых кислот NKG2D человека и мыши были слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими сигнальный домен CD3-дзета, для получения конструкций химерного антигенного рецептора (CAR). Конструкции NKG2D-CAR затем клонировали в ретровирусный вектор с использованием сборки Гибсона и трансфицировали в клетки ех1293 для получения ретровируса. Клетки EL4 инфицировали вирусами, содержащими NKG2D-CAR вместе с 8 мкг/мл полибрана. Через 24 ч после заражения уровни экспрессии NKG2D-CAR в клетках EL4 анализировали проточной цитометрией и отбирали клоны, которые экспрессируют высокие уровни NKG2D-CAR на клеточной поверхности.

Чтобы определить, активируют ли NKG2D-связывающие домены NKG2D, их адсорбировали в лунках микропланшета, и NKG2D-CAR EL4 клетки культивировали в лунках, покрытых фрагментом антитела, в течение 4 ч в присутствии брэфельдина-А и монензина. Внутриклеточную выработку TNF-альфа, индикатора активации NKG2D, анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент TNF-альфа-положительных клеток был нормализован по отношению к клеткам, обработанным положительным контролем. Все NKG2D-связывающие домены активировали NKG2D человека (фиг. 22) и мыши (фиг. 23).

Пример 4 - NKG2D-связывающие домены активируют NK-клетки

#### **Первичные NK-клетки человека**

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC - "Peripheral blood mononuclear cells") выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) выделяли с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных бус из PBMC, и чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 95%. Затем выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, в течение 24-48 ч, после чего их переносили в лунки микропланшета, на которых были адсорбированы NKG2D-связывающие домены, и культивировали в среде, содержащей конъюгированное с флуорофором антитело к CD107a, брэфельдин-А и монензин. После культивирования NK-клетки анализировали проточной цитометрией с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, CD56 и IFN-гамма. CD107a и IFN-гамма окрашивания были проанализированы в CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> клетках для оценки NK-клеточной активации. Увеличение числа CD107a/IFN-гамма дважды положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет вовлечения двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора. NKG2D-связывающие

домены и положительный контроль (выбранный из (SEQ ID NO: 45-48) показали, что более высокий процент NK-клеток становится CD107a+b IFN-гамма<sup>+</sup>, по сравнению с контрольным изотипом (фиг. 24 и фиг. 25 представляют два независимых эксперимента, каждый с использованием РВМС другого донора для получения NK-клеток).

#### Первичные NK-клетки мыши

Селезенки получали от мышей C57B1/6 и измельчали через сито для клеток с размером пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Клетки осаждали и ресуспендировали в буфере для лизиса АСК (приобретенном у Thermo Fisher Scientific #A1049201; 155 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната калия, 0,01 мМ ЭДТА) для удаления эритроцитов. Оставшиеся клетки культивировали с 100 нг/мл hIL-2 в течение 72 ч, а затем собирали и готовили для выделения NK-клеток. Затем NK-клетки (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) выделяли из клеток селезенки, с использованием метода отрицательного истощения с использованием магнитных бус, с чистотой > 90%. Очищенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл mIL-15, в течение 48 ч, после чего их переносили в лунки микропланшета, на которых были адсорбированы NKG2D-связывающие домены, и культивировали в среде, содержащей конъюгированное с флуорофором антитело к CD107a, брефельдин-А и монензин. После культивирования в лунках, покрытых NKG2D-связывающим доменом, NK-клетки анализировали проточной цитометрией с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, NK1.1 и IFN-гамма. CD107a и IFN-гамма окрашивания были проанализированы в CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> клетках для оценки NK-клеточной активации. Увеличение числа CD107a/IFN-гамма дважды положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет вовлечения двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора. NKG2D-связывающие домены и положительный контроль (выбранный из антимышиных NKG2D клонов MI-6 и CX-5 доступных от eBioscience) показали, что более высокий процент NK-клеток становится CD107a+n IFN-гамма<sup>+</sup>, по сравнению с контрольным изотипом (на фиг. 26 и 27 показаны два независимых эксперимента, в каждом из которых использовалась другая мышь для получения NK-клеток).

Пример 5 - NKG2D-связывающие домены приводят к гибели опухолевых клеток-мишеней

Анализ активации первичных NK-клеток человека и мыши продемонстрировали повышенные уровни маркеров цитотоксичности на поверхности NK-клеток после инкубации с NKG2D-связывающими доменами. Чтобы определить, приводит ли это к усилению лизиса опухолевых клеток, был использован клеточный анализ, в котором каждый NKG2D-связывающий домен превращался в моноспецифическое антитело. Fc-область была использована в качестве одной области нацеливания, в то время как Fab-область (NKG2D-связывающий домен) действовала как другая область нацеливания, для активации NK-клеток. Клетки ТНР-1, которые имеют человеческое происхождение и экспрессируют высокие уровни Fc-рецепторов, использовали в качестве мишени для опухоли и использовали набор для цитотоксичности Perkin Elmer DELFIA. Клетки ТНР-1 метили реагентом BATDA, и ресуспендировали при 10<sup>5</sup> клеток/мл в культуральной среде. Меченые клетки ТНР-1, затем были объединены с антителами к NKG2D и выделенными NK клетками мыши в лунках планшета для микротитрования при 37°C в течение 3 ч. После инкубации 20 мкл супернатанта культуры удаляли, смешивали с 200 мкл раствора европия и инкубировали при встряхивании в течение 15 минут в темноте. Флуоресценцию измеряли во времени с помощью планшет-ридера PheraStar, оборудованного модулем флуоресценции с разрешением по времени (возбуждение 337 нм, излучение 620 нм), и удельный лизис рассчитывали в соответствии с инструкциями набора.

Положительный контроль, ULBP-6-естественный лиганд для NKG2D, показал повышенный специфический лизис клеток-мишеней ТНР-1 NK-клетками мыши. Антитела к NKG2D также увеличивали специфический лизис клеток-мишеней ТНР-1, в то время как антитело к контрольному изотипу показало снижение специфического лизиса. Пунктирная линия указывает на специфический лизис клеток ТНР-1 NK-клетками мыши без добавления антител (фиг. 28).

Пример 6. Антитела к NKG2D имеют высокую термостабильность

Температуру плавления NKG2D-связывающих доменов анализировали с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии. Экстраполированные кажущиеся температуры плавления являются высокими по сравнению с типичными антителами IgG1 (фиг. 29).

Пример 7. Дисплей мультиспецифически связывающих белков усиливает способность активировать NK-клетки

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) выделяли с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных бус из РВМС, и чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 95%. Выделенные NK-клетки затем культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, в течение 24-48 ч, после чего их переносили в лунки микропланшета, на которых были адсорбированы мультиспецифические и биспецифические связывающие белки, соответственно, и культивировали в среде, содержащей конъюгированное с флуорофором антитело к CD107a, брефельдин-А и монензин. После культивирования NK-клетки анализировали проточной цитометрией с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, CD56 и IFN-гамма. CD107a

и IFN-гамма окрашивания были проанализированы в CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> клетках для оценки NK-клеточной активации. Увеличение числа CD107a/IFN-гамма дважды положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток. AL2.2 является мультиспецифическим связывающим белком, содержащим HER2-связывающий домен (трастузумаб), NKG2D-связывающий домен (ULBP-6) и Fc-домен IgG1 человека. Это было проведено посредством контролируемой реакции обмена Fab-плечами (сFAE), начиная с гомодимера трастузумаба и гомодимера ULBP-6-Fc (см. Labrijn et al. Nature Protocols 9, 2450-2463). SC2.2 представляет собой одноцепочечный белок, содержащий scFv, полученный из трастузумаба, и ULBP-6 (SEQ ID NO: 73).

SEQ ID NO: 73

MAAAAIPALLLCLPLLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRW-  
CAVQGGQVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPGLGKLNVTMAWKAQNPNVLRVVDILTEQLLDIQLENY  
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWEND-  
KDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSTTQLRATATTLILCCLLILPCFILPGI

Анализ CD107a и IFN-гамма окрашивание показали, что контрольный изотип IgG, не вызывает активацию NK-клеток, в то время как более высокий процент NK-клеток становится CD107a<sup>+</sup> и IFN-гамма<sup>+</sup> после стимуляции с мультиспецифическим связывающим белком по сравнению с биспецифическим белком, демонстрирующим более сильную активацию NK-клеток за счет вовлечения двух активирующих рецепторов (NKG2D и CD16), а не только одного (NKG2D) (фиг. 30). Ожидается, что это увеличение активации NK-клеток приведет к более сильному уничтожению опухолевых клеток.

Пример 8 - Дисплей мультиспецифически связывающих белков усиливает цитотоксичность по отношению к целевым опухолевым клеткам

#### Анализ первичной цитотоксичности NK-клеток человека

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки (CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) выделяли с использованием отрицательного отбора с помощью магнитных бус из PBMC, и чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 95%. NK-клетки затем культивировали в течение ночи в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, перед использованием в анализах цитотоксичности. На следующий день NK-клетки ресуспендировали при  $5 \times 10^5$  клеток/мл в свежей культуральной среде. Клетки рака молочной железы SKBR-3 человека метили реагентом BATDA согласно набору для измерения цитотоксичности Perkin Elmer DELFIA и ресуспендировали при  $5 \times 10^4$  клеток/мл в культуральной среде. Различные разбавления мультиспецифических связывающих белков были внесены в питательные среды. NK-клетки, меченые клетки SKBR-3 и мультиспецифически связывающие белки, затем были объединены в лунки микротитрационного планшета и инкубировали при 37° C в течение 3 ч. После инкубации 20 мкл супернатанта культуры удаляли, смешивали с 200 мкл раствора европия и инкубировали при встряхивании в течение 15 мин в темноте. Флуоресценцию измеряли во времени с помощью планшет-ридера PheraStar, оборудованного модулем флуоресценции с разрешением по времени (возбуждение 337 нм, излучение 620 нм), и удельный лизис рассчитывали в соответствии с инструкциями набора. AL0.2 является мультиспецифическим связывающим белком, содержащим HER2-связывающий домен (трастузумаб), NKG2D-связывающий домен (выбранный из (SEQ ID NO: 1-44)) и Fc-домен IgG1 человека. Это было проведено посредством контролируемой реакции обмена Fab-плечами (сFAE), начиная с гомодимера трастузумаба и гомодимера анти-NKG2D. AL0.2si основан на AL0.2 и содержит дополнительную мутацию D265A в Fc-домене, которая нивелирует связывание с CD16. Трастузумаб-si основан на трастузумабе и содержит дополнительную мутацию D265A в Fc-домене, которая нивелирует связывание CD16. AL2.2 является мультиспецифическим связывающим белком, содержащим HER2-связывающий домен (трастузумаб), NKG2D-связывающий домен (ULBP-6) и Fc-домен IgG1 человека. SC2.2 представляет собой одноцепочечный белок, содержащий scFv, полученный из трастузумаба, и ULBP-6.

AL0.2 показал усиленный лизис клеток-мишеней SkBr-3 NK-клетками человека по сравнению с трастузумабом дозозависимым образом со значением  $p$  0,0311 в EC50 (фиг. 31). AL0.2si (фиг. 32) и трастузумаб-si (фиг. 33) показали снижение как в активности, так и в максимальном специфическом лизисе клеток SkBr-3 по сравнению с AL0.2, со значением  $p$  0,0002 и 0,0001 в EC50, соответственно. (фиг. 32-33). Кроме того, AL0.2 показал усиленный лизис клеток SkBr-3, по сравнению с AL2.2, дозозависимым образом (фиг. 34). Контрольный изотип IgG не показал увеличения специфического лизиса при любой из протестированных концентраций. Вместе, данные продемонстрировали, что мультиспецифические связывающие белки, включающие 2 активирующих рецептора на NK-клетках и один опухолевый антиген, вызывают более сильное уничтожение опухолевых клеток NK-клетками человека по сравнению с биспецифическими белками, задействующими один активирующий рецептор на NK-клетках и один опухолевый антиген.

#### Анализ цитотоксичности первичных NK-клеток мыши

Селезенки получали от мышей C57B1/6 и измельчали через сито для клеток с размером пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Клетки осаждали и ресуспендировали в буфере для лизиса АСК (приобретенном у Thermo Fisher Scientific #A1049201; 155 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбона-

та калия, 0,01 мМ ЭДТА) для удаления эритроцитов. Оставшиеся клетки культивировали с 100 нг/мл hIL-2 в течение 72 ч, а затем собирали и готовили для выделения НК-клеток. Затем НК-клетки (CD3<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>) выделяли из клеток селезенки, с использованием метода отрицательного истощения с использованием магнитных бус, с чистотой > 90%. Очищенные НК-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл mIL-15 в течение 48 ч, прежде чем повторно суспендировали в культуральной среде при 10 клеток/мл для цитотоксических анализов. RMA-HER2-dTomato, линия опухолевых клеток мыши, сконструированная для экспрессии HER2 и dTomato, и ее контрольный аналог, клетки RMA, экспрессирующие zsGreen, использовали в качестве мишеней. Клетки ресуспендировали при  $2 \times 10^5$  клеток/мл в культуральной среде и высевали в лунки микропланшет при соотношении 1:1. Разведения мультиспецифического белка вносили в культуральную среду и добавляли к клеткам RMA вместе с клетками NK. После инкубации в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>, процент RMA-HER2-dTomato и клеток RMA-zsGreen определяли с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентного репортера, чтобы идентифицировать эти два типа клеток. Удельная гибель клеток-мишеней =  $(1 - ((\% \text{ RMA-Ca2T-dTomato клеток в группе лечения} / (\% \text{ RMA-zsGreen клеток в контрольной группе})) / (\% \text{ RMA-Ca2T-dTomato клеток в контрольной группе} * \% \text{ RMA-zsGreen клеток в группе лечения}))) * 100\%$ .

AL2.2 более эффективен в перенаправлении ответов NK-клеток на опухолевые мишени, чем SC2.2 (фиг. 36) и трастузумаб (фиг. 35). Контрольный белок показал небольшое влияние на специфическую гибель мишени. Эти данные демонстрируют, что мультиспецифические связывающие белки, включающие 2 активирующих рецептора на НК-клетках и один опухолевый антиген, вызывают более сильное уничтожение опухолевых клеток НК-клетками мыши по сравнению с биспецифическими белками, действующими один активирующий рецептор на НК-клетках и один опухолевый антиген.

Пример 9 - Мультиспецифические связывающие белки связываются с NKG2D

Линии клеток EL4 лимфомы мыши были сконструированы для экспрессии NKG2D человека. Трипептидные связывающие белки (TriNKET), каждый из которых содержит NKG2D-связывающий домен, ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий домен (такой как CD33-, HER2-, CD20- или BCMA-связывающий домен) и Fc-домен, который связывается с CD16, как показано на фиг. 1, анализировали на их сродство к внеклеточному NKG2D, экспрессированному на клетках EL4. Связывание мультиспецифических связывающих белков с NKG2D определяли с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и рассчитывали соотношение сигнала по сравнению с фоном (FOB) с использованием среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) NKG2D-экспрессирующих клеток по сравнению с исходными клетками EL4.

Анализируемые TriNKET включали CD33-TriNKET-C26 (ADI-28226 и CD33-связывающий домен), CD33-TriNKET-F04 (ADI-29404 и CD33-связывающий домен), HER2-TriNKET-C26 (ADI-28226 и HER2-связывающий домен), HER2-TriNKET-F04 (ADI-29404 и HER2-связывающий домен), CD20-TriNKET-C26 (ADI-28226 и CD20-связывающий домен), CD20-TriNKET-F04 (ADI-29404 и CD20-связывающий домен), BCMA-TriNKET-C26 (ADI-28226 и BCMA-связывающий домен), BCMA-TriNKET-F04 (ADI-29404 и BCMA-связывающий домен), BCMA-TriNKET-F43 (ADI-29443 и BCMA-связывающий домен) и BCMA-TriNKET-F47 (ADI-29447 и BCMA-связывающий домен). HER2-связывающий домен, используемый в тестируемых молекулах, состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи трастузумаба. CD33-связывающий домен состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, перечисленных ниже.

SEQ ID NO: 74:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDTYVVHVWRQAPGQGLEWVWGYNPYND

CDR1

GTKYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYRYEYVYGM~~D~~YWGQ

CDR2

CDR3

GTLVTVSS

SEQ ID NO: 75:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCTASSSVNYIHWYQQKPGQPPLLIYDTSKVASGVPAR

CDR1

CDR1

FSGSGSGTDFLTINPVEANDTANYYCQQWRSYPLTFGQGTKLEIK

CDR3

CD20-связывающий домен, используемый в тестируемых молекулах, состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи. BCMA-связывающий домен, используемый в тестируемых молекулах, состоял из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, перечисленных ниже.



века. Клетки анализировали проточной цитометрией и гистограмму преобразовывали в график. Как показано на фиг. 44, CD20-TriNKET-C26 и CD20-TriNKET-F04 одинаково хорошо связываются с CD20.

Пример 11 - Мультиспецифические связывающие белки активируют NK-клетки

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

Клетки рака человека, экспрессирующие антиген опухоли собирали и ресуспендировали в культуральной среде при  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Моноклональные антитела или TriNKET, нацеленные на опухолевый антиген, разводили в культуральной среде. Активированные NK-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при  $2 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде. Затем раковые клетки смешивали с моноклональными антителами/TriNKET и активировали NK-клетки в присутствии IL-2. Брефельдин-A и монензин также добавляли в смешанную культуру для блокирования транспорта белка из клетки для внутриклеточного окрашивания цитокинов. Конъюгированное с флуорофором антитело к CD107a добавляли к смешанной культуре и культуру инкубировали в течение 4 ч перед тем, как образцы были подготовлены для анализа FACS с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, CD56 и IFN-гамма. CD107a и IFN-гамма-окрашивание было проанализировано в CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клетках для оценки активации NK-клеток. Увеличение числа CD107a/IFN-гамма дважды положительных клеток свидетельствует о лучшей активации NK-клеток за счет вовлечения двух активирующих рецепторов, а не одного рецептора.

TriNKET опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивируемых с HER2-экспрессирующими клетками SkBr-3 (фиг. 47A), клетками Co1o201 (фиг. 47B) и клетками HCC1954 (фиг. 47C), соответственно, как показано увеличением дегрануляции CD107a и IFN-гамма выработки. Клетки SkBr-3 и клетки HCC1954 имеют высокий уровень поверхностной экспрессии HER2, а Co1o201 имеет средний уровень экспрессии HER2. По сравнению с моноклональным антителом трастузумабом, TriNKET демонстрируют превосходную активацию NK-клеток человека в присутствии клеток рака человека. Только NK-клетки, NK-клетки плюс клетки SkBr-3 использовали в качестве отрицательных контролей.

TriNKET (C26-TriNKET-HER2 и F04-TriNKET-HER2) опосредуют активацию NK-клеток человека, совместно культивированных с CD33-экспрессирующими клетками человека OML Mv4-11, и показали увеличение дегрануляции CD107a и выработки IFN-гамма. По сравнению с моноклональным антителом к CD33 TriNKET (C26-TriNKET-HER2 и F04-TriNKET-HER2) показали превосходную активацию NK-клеток человека в присутствии клеток рака человека, экспрессирующих HER2 (фиг. 47A-47C).

Первичные NK-клетки человека активируются TriNKET в совместной культуре с мишенью, экспрессирующей линии клеток рака человека.

Совместное культивирование первичных NK-клеток человека с CD20-положительными клетками рака человека приводило к TriNKET-опосредованной активации первичных NK-клеток человека (фиг. 62). TriNKET направленные на CD20 (например, C26-TriNKET-CD20 и F04-TriNKET-CD20), опосредовали активацию NK-клеток человека, при культивировании совместно с CD20-положительными клетками Раджи, о чем свидетельствует увеличение CD107a дегрануляции и выработки цитокинов IFN $\gamma$  (фиг. 62). По сравнению с моноклональным антителом ритуксимабом, оба TriNKET (например, C26-TriNKET-CD20 и F04-TriNKET-CD20), показали превосходную активацию NK-клеток человека (фиг. 62).

Ритуксимаб\_vH

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN

CDR1

CDR2

GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWG

AGTTVTVSA (SEQ ID NO:84)

CDR3

Ритуксимаб\_vL

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVS~~Y~~IHW~~F~~QKPGSSPKPW~~I~~YATSNLASGVP

CDR1

CDR2

VRFSGSGSGT~~S~~YSLTISRVEAEDAATYYCQ~~Q~~WTSN~~P~~PTFGG~~G~~T~~K~~LEIK (SEQ ID NO:85)

CDR3

Совместное культивирование первичных NK-клеток человека с BCMA-положительными клетками миеломы MM.1S приводило к TriNKET-опосредованной активации первичных NK-клеток человека. TriNKET направленные на BCMA (например, C26-TriNKET-BCMA и F04-TriNKET-BCMA) опосредовали активацию NK-клеток человека, при культивировании совместно с клетками миеломы MM.1S, о чем свидетельствует увеличение CD107a дегрануляции и выработки цитокинов IFN $\gamma$  (фиг. 63). По сравнению

с изотипом TriNKET, TriNKET направленные на ВСМА (например, A44-TriNKET-ВМСА, A49-TriNKET-ВМСА, С26-TriNKET-ВМСА, F04-TriNKET-ВМСА, F43-TriNKET-ВМСА, F43-TriNKET-ВМСА, F47-TriNKET-ВМСА и F63-TriNKET-ВМСА) показали повышенную активность по отношению к НК-клеткам (фиг. 63).

Пример 12 - Триспецифические связывающие белки приводят к цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням рака

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

Чтобы проверить способность НК-клеток человека лизировать раковые клетки в присутствии TriNKET, использовали анализ нерадиоактивной цитотоксичности cyto Tox 96 от Promega (G1780) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки рака человека, экспрессирующие антиген опухоли собирали, промывали и ресуспендировали в культуральной среде при  $1-2 \times 10^5$ /мл. Покоящиеся и/или активированные НК-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при  $10^5-2.0 \times 10^6$  клеток/мл в тех же культуральных средах, как и для клеток рака. В каждой лунке 96-луночного планшета 50 мкл суспензии клеток рака смешивали с 50 мкл суспензии НК-клеток с или без TriNKET, нацеленных на опухолевый антиген, экспрессируемый на раковых клетках. После инкубации при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 ч и 15 мин, 10x кратный буфер для лизиса добавляли в лунки, содержащие только раковые клетки, и в лунки, содержащие только среды для максимального лизиса и отрицательного контроля реагентов, соответственно. Затем планшет помещали обратно в инкубатор на дополнительные 45 мин для достижения общей 4-часовой инкубации. Затем клетки осаждали, и культуральный супернатант переносили в новый 96-луночный планшет и смешивали с субстратом для развития реакции. Новый планшет инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, и оптическую плотность считывали при 492 нм на Spectra-Max i3x. Процент специфического лизиса клеток рака рассчитывали следующим образом: % Специфический лизис = ((экспериментальный лизис – самопроизвольный лизис только из НК-клеток - самопроизвольный лизис только из клеток рака)/(Максимальный лизис - отрицательный контроль реагентов)) $\times 100\%$ .

TriNKET опосредуют цитотоксичность НК-клеток человека против CD33-положительной линии клеток ОМЛ человека Molm-13. Как показано на фиг. 53В, покоящиеся НК-клетки человека были смешаны с Molm-13 клетками рака, и TriNKET (например, С26-TriNKET-CD33 и F04-TriNKET-CD33) способны повысить цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток человека дозозависимым образом против клеток рака. Пунктирная линия указывает на цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток без TriNKET. Активированные НК-клетки человека смешивали с раковыми клетками Molm-13, и TriNKET дополнительно усиливают цитотоксическую активность активированных НК-клеток человека, по сравнению с антителом к CD33, дозозависимым образом против клеток рака (фиг. 53В).

TriNKET усиливают цитотоксичность НК-клеток против мишеней с низким уровнем поверхностной экспрессией по сравнению с цитотоксической активностью трастузумаба, моноклонального антитела к HER2. Покоящиеся НК-клетки человека смешивали с опухолевыми клетками SkBr, экспрессирующими HER2 на высоком уровне, и раковыми клетками 786-0, экспрессирующими HER2 на низком уровне, и способностью TriNKET усиливать цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток человека против клеток рака, экспрессирующих HER2 на высоком и низком уровне, была проанализирована в дозозависимой манере. Пунктирные линии на фиг. 50А и фиг. 50В указывают на цитотоксическую активность покоящихся НК-клеток против клеток рака в отсутствие TriNKET. Как показано на фиг. 50В, при смешивании активированных НК-клеток человека с клетками 786-0, экспрессирующими HER2 на низком уровне и TriNKET (например, CD26-TriNKET-HER2 и F04-TriNKET-HER2) наблюдали дозозависимую цитотоксическую активность активированных НК-клеток человека против клеток рака.

Определяли TriNKET-опосредованный лизис ВСМА-положительных клеток миеломы. Фиг. 64 показывает TriNKET-опосредованный лизис ВСМА-положительных клеток миеломы KMS12-PE покоящимися эффекторными НК-клетками человека. Два TriNKET (сFAE-A49.801 и сFAE-A49.901), использующие тот же NKG2D-связывающий домен (A49), но различные нацеленные на ВСМА домены, испытывали на эффективность *in vitro*. Оба TriNKET в одинаковой степени усиливали лизис НК-клетками клеток KMS12-PE, но TriNKET с использованием нацеливающего домена EM-901 обеспечивали повышенную активность.

Фиг. 65 показывает цитотоксическую активность нескольких TriNKET с использованием различных NKG2D-связывающих доменов (A40, A44, A49, С26 и F47), но одного и того же домена, нацеленного на ВСМА. Изменение NKG2D-связывающего домена TriMAKET, нацеленного на ВСМА, приводило к изменениям максимального уничтожения, а также эффективности TriNKET. Все TriNKET продемонстрировали повышенное уничтожение клеток-мишеней KMS12-PE по сравнению с моноклональным антите-

лом EM-901 (фиг. 65).

Пример 13.

Была исследована синергическая активация NK-клеток человека путем сшивания NKG2D и CD16.

#### **Первичный анализ активации NK-клеток человека**

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки очищали от PBMC с использованием отрицательных магнитных бус (StemCell # 17955). NK-клетки были > 90% CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, как определено с помощью проточной цитометрии. Затем клетки размножали 48 ч в среде, содержащей 100 нг/мл hIL-2 (Peprotech # 200-02), перед использованием в анализах активации. Антитела наносили на 96-луночный планшет с плоским дном в концентрации 2 мкг/мл (анти-CD16, Biolegend # 302013) и 5 мкг/мл (анти-NKG2D, R&D # MAB139) в 100 мкл стерильного PBS в течение ночи при 4°C с последующим тщательным промыванием лунок для удаления избытка антител. Для оценки дегрануляции IL-2-активированные NK-клетки ресуспендировали в  $5 \times 10^5$  клеток/мл в культуральной среде с добавлением 100 нг/мл hIL2 и 1 мкг/мл APC-конъюгированного анти-CD107a mAb (BioLegend # 328619).  $1 \times 10^5$  клеток/лунку затем были добавлены в планшеты покрытые антителами. Ингибиторы транспорта белка брэфельдин А (BFA, Biolegend # 420601) и монензин (Biolegend # 420701) добавляли в конечном разведении 1:1000 и 1:270, соответственно. Клетки в планшетах инкубировали в течение 4 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Для внутриклеточного окрашивания IFN- $\gamma$  NK-клетки метили анти-CD3 (Biolegend # 300452) и анти-CD56 mAb (Biolegend # 318328), а затем фиксировали и пермеабелизировали и метили анти-IFN- $\gamma$  mAb (Biolegend # 506507). NK-клетки анализировали на экспрессию CD107a и IFN- $\gamma$  с помощью проточной цитометрии после гейтирования на живые клетки CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>.

Чтобы исследовать относительную эффективность комбинации рецепторов, проводили сшивание NKG2D или CD16 и совместное сшивание обоих рецепторов посредством планшетсвязанной стимуляции. Как показано на фиг. 45 (фиг. 45A-45C), комбинированная стимуляция CD16 и NKG2D приводила к сильно повышенным уровням CD107a (дегрануляция) (фиг. 45A) и/или выработке IFN- $\gamma$  (фиг. 45B). Пунктирные линии представляют аддитивный эффект отдельных стимуляций каждого рецептора.

Уровни CD107a и внутриклеточную выработку IFN- $\gamma$  в активированных IL-2 NK-клетках анализировали после 4 ч планшетсвязанной стимуляции, анти-CD16, анти-NKG2D или комбинацией обоих моноклональных антител. Графики показывают среднее значение ( $n=2$ )  $\pm$ SD. Фиг. 45A демонстрирует уровни CD107a; фиг. 45B демонстрирует уровни IFN $\gamma$ ; фиг. 45C демонстрирует уровни CD107a и IFN- $\gamma$ . Данные, показанные на фиг. 45A-45C представляют собой пять независимых экспериментов с использованием пяти различных здоровых доноров.

Дегрануляцию CD107a и внутриклеточную выработку IFN- $\gamma$  в NK-клетках, активированных IL-2, анализировали после 4 ч планшетсвязанной стимуляции трастузумабом, анти-NKG2D или TriNKET, полученным из доменов связывания трастузумаба и антитела к NKG2D (фиг. 46). Во всех случаях испытанные антитела имели изотип IgG1 человека. Графики показывают среднее значение ( $n=2$ )  $\pm$ SD.

Пример 14. Оценка связывания TriNKET с экспрессируемым в клетках NKG2D человека

Клетки EL4, трансдуцированные NKG2D человека, использовали для тестирования связывания с экспрессируемым в клетках NKG2D человека. TriNKET были разбавлены до 20 мкг/мл, а затем разбавлены серийно. Разведения mAb или TriNKET использовали для окрашивания клеток, а связывание TriNKET или mAb определяли с использованием конъюгированного с флуорофором вторичного антитела к IgG человека. Клетки анализировали проточной цитометрией, связывание MFT было нормализовано к вторичным контрольным антителам для получения кратности по сравнению с фоновыми значениями.

#### **Оценка связывания TriNKET с клеточно-экспрессированными антигенами рака человека**

Линии клеток рака человека, экспрессирующие CD33 или HER2, использовали для оценки связывания опухолевого антигена с TriNKET, полученными из различных клонов, нацеленных на NKG2D. Клеточную линию ОМЛ человека MV4-11 использовали для оценки связывания TriNKET с экспрессируемым в клетке CD33. Клеточная линия 786-0 рака почек человека экспрессирует низкие уровни HER2 и была использована для оценки связывания TriNKET с клеточно-экспрессированным HER2. TriNKET разбавляли до 20 мкг/мл и инкубировали с соответствующими клетками. Связывание TriNKET детектировали с использованием конъюгированного с флуорофором вторичного антитела к IgG человека. Клетки анализировали проточной цитометрией, MFT связывания с экспрессированными в клетке CD33 и HER2 нормализовали к вторичным контрольным антителам для получения кратности по сравнению с фоновыми значениями.

#### **Определение способности к связыванию антител с линиями HER2-положительных клеток рака человека**

Была измерена способность связывания антител (ABC) с линиями HER2-положительных клеток рака человека. Использовался набор Quantum Simply Cellular от Bangs Lab (# 815), и для получения бус, меченных антителами, следовали инструкциям производителя. Вкратце, каждую из четырех популяций бус окрашивали насыщенным количеством антитела к HER2, а популяции клеток также окрашивали насыщенным количеством того же антитела. Данные выборки были получены для каждой популяции

бус, а также для популяций клеток. Рабочий лист QuickCal, поставляемый с набором, использовался для генерации стандартной кривой и экстраполяции значений ABC для каждой из клеточных линий.

#### **Активация первичных NK-клеток с помощью TriNKET**

РВМС выделяли из лейкоцитомбоцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Изолированные РВМС были промыты и подготовлены для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли, используя метод отрицательного отбора с магнитными бусами; чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2 для активации, или оставляли на ночь без цитокина. IL-2-активированные NK-клетки использовали через 24-48 ч; покоящиеся NK-клетки всегда использовали на следующий день после очистки.

Линии клеток рака человека, экспрессирующие целевую раковую мишень собирали из культуры, и клетки доводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Моноклональные антитела или TriNKET, нацеленные на целевую раковую мишень, разводили в культуральной среде. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при  $2 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде. IL-2 и конъюгированный с флуорофором анти-CD107a добавляли к NK-клеткам для активации культуры. Брефельдин-А и монензин разводили в культуральной среде для блокирования транспорта белка из клетки для внутриклеточного окрашивания цитокинов. В 96-луночный планшет добавляли 50 мкл опухолевых мишеней, mAb/TriNKET, BFA/монензин и NK-клетки для общего объема культуры 200 мкл. Планшет культивировали в течение 4 ч, прежде чем образцы были подготовлены для анализа FACS.

После 4-часовой активации культуры клеток готовили для анализа методом проточной цитометрии с использованием конъюгированных с флуорофором антител к CD3, CD56 и IFN $\gamma$ . Окрашивание CD107a и IFN $\gamma$  анализировали в популяциях CD3-CD56+ для оценки активации NK-клеток.

#### **Анализ первичной цитотоксичности NK-клеток человека**

РВМС выделяли из лейкоцитомбоцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Изолированные РВМС были промыты и подготовлены для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли, используя метод отрицательного отбора с магнитными бусами; чистота выделенных NK-клеток обычно составляла >90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, или оставляли на ночь без цитокина. Активированные IL-2 или покоящиеся NK-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

#### **Анализ высвобождения Cyto Tox 96 LHD**

Способность NK-клеток человека лизировать опухолевые клетки измеряли с добавлением или без добавления TriNKET с использованием анализа нерадиоактивной цитотоксичности cyto Tox 96 от Promega (G1780). Линии клеток рака человека, экспрессирующие целевую раковую мишень собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в среде роста при  $1-2 \times 10^5$  клеток/мл для использования в качестве клеток-мишеней. 50 мкл суспензии клеток-мишеней добавляли в каждую лунку.

Моноклональные антитела или TriNKET, нацеленные на представляющий интерес раковый антиген, разводили в культуральной среде, в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенного mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при  $10^5-2,0 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде в зависимости от желаемого Е:Т соотношения. 50 мкл NK-клеток добавляли в каждую лунку планшета, чтобы получить общий объем культуры 150 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO $_2$  в течение 3 ч и 15 мин. После инкубации 10 $\times$  буфер для лизиса добавляли в лунки только с клетками-мишенями и в лунки, содержащие только среду, для максимального лизиса и контроля объема. Затем планшет помещали обратно в инкубатор на дополнительные 45 мин, чтобы довести общее время инкубации до развития реакции в течение 4 ч.

После инкубации планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. 50 мкл культурального супернатанта переносили в чистый микропланшет и 50 мкл раствора субстрата добавляли в каждую лунку. Планшет защищали от света и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора и измеряли оптическую плотность при 492 нм на SpectraMax i3x. % Удельного лизиса рассчитывали следующим образом: % Удельного лизиса = ((Экспериментальное высвобождение-Самопроизвольное высвобождение из эф-фектора-Самопроизвольное высвобождение из мишени)/(Максимальное высвобождение-Самопроизвольное высвобождение))\*100%.

#### **Анализ цитотоксичности DELFIA**

Линии клеток рака человека, экспрессирующие целевую раковую мишень собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в средах для роста при  $10^6$  клеток/мл для мечения BATDA реагентом (Perkin Elmer ADO116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в  $0,5-1,0 \times 10^5$  клеток/мл в культуральной среде. Для приготовления фоновых лунок аликвоту меченых клеток отбирали, и клетки извлекали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторениях, чтобы не повредить гранулированные клетки. 100 мкл BATDA-меченных клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Лунки были сохранены для спонтанного высвобождения из клеток-мишеней, и лунки были подготовле-

ны для максимального лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Тритон-Х. Моноклональные антитела или TriNKET против интересующей опухоли-мишени разводили в культуральной среде и в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенного mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при  $10^5$ - $2,0 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде в зависимости от желаемого Е:Т соотношения. 50 мкл NK-клеток добавляли в каждую лунку планшета, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> за 2-3 ч до проявления теста.

После культивирования в течение 2-3 ч планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 15 мин. Планшет считывали с использованием инструментов Victor 3 или SpectraMax i3X. % Удельного лизиса рассчитывали следующим образом: % Удельного лизиса = ((Экспериментальное высвобождение-спонтанное высвобождение)/(Максимальное высвобождение-Спонтанное высвобождение))\*100%.

#### **Долгосрочный анализ цитотоксичности РВМС человека**

Клетки-мишени SkBr-3 были помечены BacMam 3.0 NuCLight Green (# 4622) для отслеживания клеток-мишеней. Для мечения клеток-мишеней SkBr-3 следовали протоколу производителя. Аннексин V Красный (Essen Bioscience # 4641) разбавляли и готовили в соответствии с инструкциями производителя. Моноклональные антитела или TriNKET разводили в культуральной среде. 50 мкл mAb или TriNKET, аннексина V и оставшихся NK-клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета, уже содержащего меченые клетки SkBr-3; Добавляли 50 мкл полной культуральной среды для общего объема культуры 200 мкл.

Сбор изображений была настроен на IncuCyte S3. Изображения для фазового, зеленого и красного каналов собирали каждый час, по 2 изображения на лунку. Анализ изображений проводился с использованием программного обеспечения IncuCyte S3. Маски для зеленого и красного каналов были созданы для подсчета количества опухолевых клеток и аннексин V-положительных клеток, соответственно. Для расчета % аннексин V положительных клеток-мишеней Mv4-11 использовали следующую формулу. % Аннексин V положительных клеток SkBr-3 = ((количество перекрывающихся объектов)/(количество зеленых объектов))\*100%.

#### **Сравнение TriNKET, нацеленного на раковые клетки HER+c SC2.2**

TriNKET, нацеленный на HER2, более эффективен, чем трастузумаб, для уменьшения количества клеток SkBr-3, и только 60% клеток с нулевого времени оставалось после 60 часов. TriNKET настоящего изобретения, нацеленный на HER2 экспрессирующие опухолевые/раковые клетки, был более эффективен, чем SC2.2 -одноцепочечная биспецифическая молекула, построенная из scFv, полученного из трастузумаба, связанного с ULBP-6, лигандом для NKG2D. SC2.2 связывает раковые клетки HER2+ и NKG2D+ NK-клетки одновременно. Поэтому была исследована эффективность SC2.2 в снижении количества раковых клеток HER2+. Анализы активации и цитотоксичности *in vitro* показали, что SC2.2 эффективен в активации и уничтожении NK-клеток. Однако SC2.2 не смог продемонстрировать эффективность в модели подкожной опухоли RMA/S-HER2. Эффективность SC2.2 также тестировали *in vivo* с использованием модели сингенной мыши со сверхэкспрессирующей RMA/S-HER2. В этой мышинной модели SC2.2 не смог продемонстрировать контроль роста опухоли по сравнению с контролем носителя. Таким образом, хотя SC2.2 был способен активировать и убивать NK-клетки, и связываться с раковыми клетками HER2+, эти свойства были недостаточны для эффективного контроля роста опухоли HER2+.

Оценка периода полувыведения SC2.2 из сыворотки у мышей C57B1/6 Для определения периода полувыведения SC2.2 из сыворотки у мышей C57B1/6, SC2.2 метили флуоресцентной меткой для отслеживания его концентрации *in vivo*. SC2.2 метили с помощью IRDye 800CW (Licor # 929-70020). Меченый белок вводили внутривенно 3 мышам C57B1/6, кровь отбирали у каждой мыши в указанные моменты времени. После сбора кровь центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин и из каждого образца отбирали сыворотку и хранили при 4°C до тех пор, пока не были собраны все временные точки.

Сыворотку визуализировали с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey CLx, флуоресцентный сигнал с 800 канала количественно определяли с использованием программного обеспечения Image J. Интенсивности изображения были нормализованы к первому моменту времени, и данные соответствовали двухфазному уравнению затухания. В этой экспериментальной системе бета-период полувыведения SC2.2 составлял около 7 ч.

#### **In vivo тестирование SC2.2 против подкожных опухолей RMA/S-HER2**

Исследование *in vivo* было разработано в соответствии с фиг. 56 для проверки эффективности SC2.2 против подкожных опухолей RMA/S-HER2.  $10^6$  клеток RMA/S, трансдуцированных человеческим HER2, подкожно инъецировали в бок 20 мышам C57B1/6. Начиная со 2-го дня после инокуляции опухоли, SC2.2 ежедневно вводили внутривенно. SC2.2 был дозирован в высоких и низких концентрациях наряду с контролем носителем. Начиная с 4-го дня после инокуляции опухоли, опухоли измеряли в понедельник, среду и пятницу на протяжении всего исследования. Объем опухоли рассчитывали по сле-

дующей формуле: объем опухоли=длина × ширина × высота TriNKET связываются с клетками, экспрессирующими NKG2D человека. Была определена способность TriNKET связывать клетки, экспрессирующие NKG2D человека. Фиг. 37 и 38 показывают дозозависимое связывание двух TriNKET, содержащих разные NKG2D-связывающие домены. На фиг. 37 продемонстрировано связывание двух TriNKET, когда CD33-связывающий домен используется в качестве второго нацеливающего плеча. На фиг. 38 продемонстрированы те же два NKG2D-связывающих домена, которые в таких условиях соединены со вторым нацеливающим плечом HER2. Шесть NKG2D-связывающих доменов сохраняют один и тот же профиль связывания с обоими нацеливающими на опухоль доменами.

TriNKET связываются с клетками, экспрессирующими антигены рака человека.

Была определена способность TriNKET связывать клетки, экспрессирующие антигены рака человека. Фиг. 41 и фиг. 42 показывают связывание TriNKET с экспрессирующими CD33 (фиг. 41) и HER2 (фиг. 42) клетками. Связывание TriNKET с клеточно-экспрессируемым антигеном было согласованным между NKG2D-связывающими доменами. TriNKET связывались с сопоставимыми родительскому моноклональному антителу уровнями.

#### **Способность антител связывать линии HER2-положительных клеток рака человека**

В табл. 8 приведены результаты количественного определения уровня поверхностного HER2. Было установлено, что клетки SkBr-3 и HCC1954 имеют высокие (+++) уровни поверхностного HER2. ZR-75-1 и Colo201 показали средние уровни (++) поверхностного HER2, а 786-0 показала самый низкий уровень поверхностного HER2 (+).

Таблица 8. ABC HER2-положительных клеточных линий рака

Клеточная линия	Экспрессия HER2	ABC
786-0	Низкая	28162
Colo201	Средняя	273 568
ZR-75-1	Средняя	281 026
SKBR-3	Высокая	6 820 532
HCC1954	Высокая	10 569 869

Первичные NK-клетки человека активируются TriNKET в совместной культуре с линиями рака человека, экспрессирующими различные уровни HER2.

Фиг. 47A-47C показывают, что TriNKET и трастузумаб способны активировать первичные NK-клетки человека в совместной культуре с HER2-положительными опухолевыми клетками человека, на что указывает увеличение дегрануляции CD107a и выработки цитокинов IFN $\gamma$ . По сравнению с моноклональным антителом трастузумабом оба TriNKET продемонстрировали превосходную активацию NK-клеток человека с различными клетками HER2 рака человека.

На фиг. 47A продемонстрировано, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками SkBr-3. На фиг. 47B продемонстрировано, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками Colo201. Фиг. 47C показывает, что NK-клетки человека активируются TriNKET при культивировании с клетками HCC1954.

#### **TriNKET усиливают активность покоящихся и активированных IL-2 NK-клеток человека**

Фиг. 48A-48B показывают TriNKET-опосредованную активацию покоящихся или IL-2-активированных NK-клеток человека в совместной культуре с CD33-экспрессирующей линией клеток ОМЛ человека MV4-11. Фиг. 48A показывает TriNKET-опосредованную активацию покоящихся NK-клеток человека. На фиг. 48B продемонстрирована TriNKET-опосредованная активация NK-клеток человека от того же донора. Покоящиеся NK-клетки показали меньшую фоновую выработку IFN $\gamma$  и дегрануляцию CD107a, чем NK-клетки, активированные IL-2. Покоящиеся NK-клетки показали большее изменение в выработке IFN $\gamma$  и дегрануляции CD107a по сравнению с NK-клетками, активированными IL-2. NK-клетки, активированные IL-2, показали больший процент клеток, становящихся IFN $\gamma$  +; CD107a+ после стимуляции TriNKET.

#### **TriNKET усиливают цитотоксичность покоящихся и активированных IL-2 NK-клеток человека**

Фиг. 49A-49B показывают усиление TriNKET цитотоксической активности с использованием активированных IL-2 и покоящихся NK-клеток человека. На фиг. 49A продемонстрирован процент специфического лизиса опухолевых клеток SkBr-3 покоящимися NK-клетками человека. На фиг. 49B продемонстрирован процент специфического лизиса опухолевых клеток SkBr-3 активированными IL-2 NK-клетками человека. Активированные IL-2 и покоящиеся популяции NK-клеток происходили от одного и того же донора. По сравнению с трастузумабом, TriNKET более эффективно направляют ответы против клеток SkBr-3 либо активированными, либо покоящимися популяциями NK-клеток.

### **TriNKET усиливают цитотоксичность NK-клеток в отношении мишеней с низкой поверхностной экспрессией**

Фиг. 50А-50В показывают, что TriNKET обеспечивают большее преимущество против рака с средним и низким уровнем HER2 по сравнению с трастузумабом. Фиг. 50А показывает уничтожение активированными NK-клетками человека опухолевых клеток SkBr-3 с высоким уровнем HER2. Фиг. 50В показывает уничтожение NK-клетками человека опухолевых клеток 786-О с низким уровнем HER2. TriNKET обеспечивают большее преимущество по сравнению с трастузумабом против клеток рака с низким уровнем экспрессии HER2. TriNKET обеспечивают наибольшее преимущество по отношению к целям с низким уровнем поверхностной экспрессии.

### **Преимущество TriNKET в лечении рака с высоким уровнем экспрессии FcR или в микроокружении опухоли с высоким уровнем FcR**

Терапия моноклональными антителами была одобрена для лечения многих типов рака, включая как гематологические, так и солидные опухоли. Хотя использование моноклональных антител в лечении рака улучшило результаты лечения пациентов, все еще существуют ограничения. Механистические исследования показали, что моноклональные антитела оказывают свое влияние на рост опухоли посредством множества механизмов, включая ADCC, CDC, фагоцитоз и сигнальную блокаду среди других.

В частности, считается, что ADCC является основным механизмом, посредством которого моноклональные антитела оказывают свое влияние. ADCC основывается на взаимодействии Fc антител с низким сродством Fc $\gamma$ RIII (CD16) на поверхности естественных клеток-киллеров, которые обеспечивают прямой лизис опухолевой клетки. Среди Fc $\gamma$ R CD16 обладает наименьшим сродством к IgG Fc, Fc $\gamma$ RI (CD64) является FcR с высоким сродством и связывается около в 1000 раз сильнее с IgG Fc, чем CD16.

CD64 обычно экспрессируется на многих гематопоетических линиях, таких как миелоидная линия, и может экспрессироваться на опухолях, происходящих из этих типов клеток, таких как острая миелоидная лейкемия (ОМЛ). Иммунные клетки, проникающие в опухоль, такие как MDSC и моноциты, также экспрессируют CD64 и, как известно, проникают в микроокружение опухоли. Экспрессия CD64 опухолью или в микроокружении опухоли может оказывать негативное воздействие на терапию моноклональными антителами. Экспрессия CD64 в микроокружении опухоли затрудняет взаимодействие этих антител с CD16 на поверхности NK-клеток, поскольку антитела предпочитают связывать высокоаффинный рецептор. Посредством нацеливания на два активирующих рецептора на поверхности NK-клеток TriNKET могут быть способны преодолеть пагубное влияние экспрессии CD64 на терапию моноклональными антителами.

### **Экспрессия FcR $\gamma$ I (CD64) на поверхности клеток трех клеточных линий ОМЛ**

Была разработана *in vitro* культуральная система, чтобы проверить активность TriNKET и моноклональных антител против опухолей с высокими и низкими уровнями поверхностной экспрессии CD64. Molm-13 и ТНР-1 представляют собой две клеточные линии ОМЛ человека, которые имеют сходный уровень экспрессии поверхностного CD33, но клетки Molm-13 не экспрессируют CD64, тогда как клетки ТНР-1 экспрессируют CD64 на своей поверхности (фиг. 51А-51С). Используя моноклональные антитела или TriNKET, направленные на мишень CD33, тестировали влияние экспрессии CD64 опухолью на моноклональные антитела или терапию TriNKET. Фиг. 51А-51С показывают уровни экспрессии высокоаффинного FcR $\gamma$ I (CD64) в трех линиях клеток ОМЛ человека, клеточной линии Molm-13 (фиг. 51А), клеточной линии Mv4-11 (фиг. 51В) и клеточной линии ТНР-1. (фиг. 51С). Клетки Molm-13 не экспрессируют CD64, в то время как клетки Mv4-11 имеют низкий уровень экспрессии, а ТНР-1 имеют высокий уровень экспрессии CD64 на клеточной поверхности.

### **TriNKET имеют преимущество в нацеливании на опухолевые клетки с высоким уровнем поверхностной экспрессии FcR**

Фиг. 52А-52В показывают опосредованную моноклональными антителами или TriNKET активацию NK-клеток человека в совместной культуре с клетками либо Molm-13 (фиг. 52В), либо ТНР-1 (фиг. 52А). Моноклональное антитело к CD33 человека продемонстрировало хорошую активацию NK-клеток человека в системе совместной культуры Molm-13, о чем свидетельствует повышенная дегрануляция CD107a и выработка IFN $\gamma$ . Моноклональное антитело не действует в системе совместной культуры ТНР-1, где высокие уровни CD64 присутствуют в опухоли. Интересно, что TriNKET были эффективны против клеток Molm-13 (фиг. 52В) и ТНР-1 (фиг. 52А), в то время как моноклональные антитела не способны активировать NK-клетки в культуре с клетками FcR-Hi ТНР-1, указывая на то, что TriNKET способны преодолеть связывание с CD64 на поверхности опухоли и эффективно нацелить NK-клетки для активации. Двойное нацеливание двух активирующих рецепторов на NK-клетки обеспечивало более сильное специфическое связывание с NK-клетками. Моноклональные антитела, которые нацелены только на CD16 на NK-клетках, могут связываться с другими высокоаффинными FcR и предотвращать взаимодействие с CD16 на NK-клетках.

Анализ цитотоксичности NK-клеток человека с использованием систем совместной культуры Molm-13 и ТНР-1 предоставляют дополнительные доказательства, подтверждающие эффективность TriNKET в присутствии высоких уровней CD64. В этих анализах цитотоксичности была использована

третья линия клеток ОМЛ человека, Mv4-11. Клетки Mv4-11 экспрессируют низкие уровни CD64 и попадают между клетками ТНР-1 и Molm-13 относительно уровней CD64 на их поверхности (фиг. 51А-51С).

### **TriNKET демонстрируют эффективность в клеточных линиях ОМЛ независимо от уровня экспрессии FcγRI**

Фиг. 53А-53С показывают анализы цитотоксичности НК-клеток человека с использованием трех линий клеток ОМЛ человека в качестве мишеней. Моноклональное антитело к CD33 показывает хорошую эффективность против клеток Molm-13 (фиг. 53В), которые не экспрессируют CD64. Клетки Mv4-11 (фиг. 53А), которые экспрессируют CD64, но на более низком уровне, чем ТНР-1, показали пониженную эффективность в случае с моноклональным анти-CD33. Клетки ТНР-1 (фиг. 53С) не проявляли эффекта в случае только с моноклональным анти-CD33. Независимо от уровня экспрессии CD64 на поверхности опухолевых клеток, TriNKET были способны опосредовать ответы НК-клеток человека против всех опухолевых клеток, протестированных в настоящем документе.

Фиг. 53А-53С показывают, что клетки ТНР-1 были защищены от терапии моноклональными антителами из-за высокого уровня экспрессии высокоаффинного FcR на их поверхности. TriNKET обошли эту защиту, воздействуя на два активирующих рецептора на поверхности НК-клеток. Данные по цитотоксичности напрямую коррелировали с тем, что было замечено в экспериментах по активации в совместной культуре. TriNKET были способны обойти защиту от mAb-терапии, наблюдаемой с клетками ТНР-1, и индуцировать лизис, опосредованный НК-клетками, несмотря на высокий уровень FcR.

Уничтожение нормальных миелоидных и нормальных В-клеток в культурах PBMC: TriNKET обеспечивает лучший профиль безопасности благодаря меньшему количеству побочных эффектов, вызванных связыванием с мишенью вне опухоли.

Естественные клетки-киллеры и CD8 Т-клетки способны непосредственно лизировать опухолевые клетки, хотя механизмы, посредством которых НК-клетки и CD8 Т-клетки распознают нормальные клетки от опухолевых клеток, отличаются. Активность НК-клеток регулируется балансом сигналов от активирующих (NCR, NKG2D, CD16 и т.д.) и ингибирующих (KIR, NKG2A и т.д.) рецепторов. Баланс этих активирующих и ингибирующих сигналов позволяет НК-клеткам определять здоровые аутоклетки из стрессированных, инфицированных вирусом или трансформированных аутоклеток. Этот "встроенный" механизм аутоотолерантности поможет защитить нормальную здоровую ткань от ответов НК-клеток. Чтобы расширить этот принцип, аутоотолерантность НК-клеток позволит TriNKET нацеливать на антигены, экспрессируемые как на поверхности аутоклеток, так и на поверхности опухоли, без побочных эффектов или с увеличенным терапевтическим окном.

В отличие от естественных клеток-киллеров Т-клеткам требуется распознавание специфического пептида, представленного молекулами МНС для активации и эффекторных функций. Т-клетки были основной целью иммунотерапии, и было разработано много стратегий для перенаправления Т-клеточных ответов против опухоли. Биспецифические Т-клетки, ингибиторы контрольных точек и CAR-Т-клетки были одобрены FDA, но часто оказывают дозозимитирующее токсическое действие. Биспецифические Т-клетки и CAR-Т-клетки работают вокруг системы распознавания ТCR-МНС, используя связывающие домены для нацеливания антигенов на поверхности опухолевых клеток и используя сконструированные сигнальные домены для передачи сигналов активации в эффекторную клетку. Несмотря на то, что эти способы лечения эффективны для выявления противоопухолевого иммунного ответа, они часто сочетаются с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) и побочными эффектами, вызванными связыванием с мишенью вне опухоли. TriNKET уникальны в этом контексте, поскольку они не будут "перекрывать" естественные системы активации и ингибирования НК-клеток. Вместо этого TriNKET предназначены для изменения баланса и обеспечения дополнительных сигналов активации для НК-клеток, сохраняя при этом толерантность НК к здоровым аутоклеткам.

PBMC выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте плотности. Любые загрязняющие эритроциты лизировали путем инкубации в буфере для лизиса АСК. PBMC промывали 3 раза в PBS, и подсчитывали общее количество PBMC. Концентрацию PBMC довели до 10 клеток/мл в первичной среде для культивирования клеток. 1 мл PBMC высевали в лунки 24-луночного планшета, указанные TriNKET или mAb добавляли в культуры PBMC в концентрации 10 мкг/мл. Клетки культивировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день (спустя 24 ч) PBMC собирали из культуры и готовили для анализа FACS. Процент CD45<sup>+</sup>; CD19<sup>+</sup> В-клеток и CD45<sup>+</sup>; CD33<sup>+</sup>; CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток анализировали в разных группах лечения.

Фиг. 54В и 54D показывают, что аутологичные миелоидные клетки защищены от TriNKET-опосредованных ответов НК-клеток. Фиг. 54А и 54В показывают, что В-клетки от здорового донора чувствительны к лизису, опосредованному TriNKET, в то время как миелоидные клетки устойчивы к лизису TriNKET. PBMC, обработанные TriNKET, нацеленные на CD20, показали пониженную частоту CD19<sup>+</sup> В-клеток с популяцией CD45<sup>+</sup> лимфоцитов (фиг. 54А), но не влияли на популяцию CD45<sup>+</sup>, CDD3<sup>-</sup>, CD56-лимфоцитов (фиг. 54С). В этих культурах частота CD45<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> миелоидных клеток (фиг. 54В) или частота CD33<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток (фиг. 54D) не изменялась.

TriNKET опосредуют hPBMC уничтожение опухолевых клеток SkBr-3 в длительных совместных

культурах

### Анализ цитотоксичности первичных РВМС человека

Фиг. 55 показывает длительное уничтожение клеток SkBr-3 в культуре с РВМС человека. При культивировании отдельно клетки SkBr-3 пролиферируют и их количество почти удваивается за 60 ч. Когда РВМС человека добавляют к клеткам SkBr-3 в культуре, скорость пролиферации замедляется, а когда добавляется изотипный TriNKET, нацеленный на CD33, пролиферация также замедляется, но в меньшей степени. При обработке культур трастузумабом SkBr-3 больше не размножается, и через 60 ч остается только 80% клеток по сравнению с моментом нулевого времени. Поскольку клетки SkBr-3 чувствительны к блокам сигнала HER2, влияние на рост клеток SkBr-3 может быть опосредовано блокадой сигнала HER2 или с помощью эффекторных функций Fc, таких как ADCC.

Пример 15. Противоопухолевая эффективность mcFAE-C26.99 TriNKET in vitro

Для проверки активности связывания cFAE-C26.99 TriNKET мыши, прямое связывание измеряли по сравнению с его моноклональными антителами с помощью анализов с помощью проточной цитометрии относительно Тугр-1-положительных клеток меланомы B16F10 (фиг. 58A) и линии EL4, сверхэкспрессирующей NKG2D мыши (EL4-mNKG2D, фиг. 58B).

Чтобы проверить, сохраняют ли mcFAE-C26.99 TriNKET способность опосредовать цитотоксичность, измеряли уничтожение Тугр-1-положительных опухолевых мишеней B16F10 IL-2-активированными NK-клетками мыши. Как показано на фиг. 59, NK-клетки мыши увеличивали свою цитотоксическую активность в присутствии mcFAE-C26.99. Важно отметить, что моноклональное антитело к Тугр-1 TA99 проявляло только незначительные эффекты.

### Повышенная цитотоксичность NK, опосредованная mcFAE-C26.99 TriNKET

Приблизительно  $5 \times 10^3$  клеток меланомы B16F10 на лунку высевали за два дня до анализа. В день эксперимента  $5 \times 10^4$  IL-2-активированных NK-клеток мыши добавляли в присутствии TA99 моноклонального антитела или mcFAE-C26.99 TriNKET (mcFAE-C26.99 является гетеродимером mC26 и TA99 с IgG2c мыши в качестве Fc. Мутации Gm относятся к мутациям гетеродимеризации, используемым для получения гетеродимера). Использовали 20 мкг/мл антител с четырехкратными разведениями. Через 4 ч совместного культивирования процент цитотоксичности оценивали с использованием набора CytoTox96 для высвобождения LDH. Пунктирная линия представляет базовую цитотоксичность в отсутствие антител.

mC26\_hvL\_mCL (жирный шрифт) (выделенные курсивом подчеркнутые аминокислоты являются мутациями гетеродимеризации, используемыми для получения гетеродимера):

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPKGKAPKLLIYKASSLES  
GVPSRFRSGSGSGETFTLTISSLQPDFATYYCQQYGSFPITFGGGTKVEIKRADAAPT  
VSI  
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWIKIDGSEKQNGVLSWTDQSKDSTY  
SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:86)

mC26\_hvH\_IgG2CmB

QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGWIDHS  
GSTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGT  
L  
VTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT  
FPALLQSGLYTSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKDKIEPRVPIQNP  
CPP  
LKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPMVTCVVVDVSEDDPDVQISW  
FV  
NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKFEKCKVNNRALPSPIEK  
TISKPRGPVRAQVYVLPVPPAEEMTKKEFSLTCMIKGFPAEIAVDWTSNGRTEQN  
YKNTATVLDSDGSGYLMYSRLRVQKSTWERSLFACSVVHEGLHNHLTKTISRSLG  
K (SEQ ID NO:87)

TA99\_mvL\_mCL

DIQMSQSPASLSASVGETVITCRASGNIYNYLAWYQQKQKSPHLLVYDAKTL  
ADGVPSRFRSGSGTQYSLKISSLTQEDSGNYCQHFWSLPFTFGSGTKLEIKRADAAPT  
VSI  
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWIKIDGSEKQNGVLSWTDQSKDSTY  
TYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:88)

TA99\_mvH\_IgG2CmA

EVQLQQSGAELVRPAGLVKLSCKTSGFNKDYFLHWVRQRPDQGLEWIGWINPD  
NGNTVYDPKFQGTASLTADTSSNTVYVYLSGLTSEDTAVYFCTRRDITYEKAALDYWG  
QGASVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS  
GVHTFPALLQSGLYTSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKDKIEPRVPIQ  
N  
PCPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPMVTCVVVDVSEDDPDVQIS  
WVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKFEKCKVNNRALPS  
PIEKTISKPRGPVRAQVYVLPVPPAEEMTKKEFSLTCMITGFPAEIAVDWTSNGRT  
EQNYKNTATVLDSDGSGYLMYSKLTQVQKSTWERSLFACSVVHEGLHNHLTKTISR  
RSLGK (SEQ ID NO:89)

Пример 16. Противоопухолевая эффективность mcFAE-C26.99 TriNKET in vivo

Для того, чтобы проверить, вызывает ли mcFAE-C26.99 противоопухолевые функции in vivo, C57BL/6 мышам вводили подкожно  $2 \times 10^5$  B16F10 опухолевых клеток. Мышам вводили либо контроль-

ный изотип, моноклональное антитело TA99, либо TriNKET mcFAE-C26.99. Обработка моноклональным антителом TA99 показала такое же прогрессирование опухоли, что и в контрольной группе, получавшей лечение изотипом. Однако введение mcFAE-C26.99 TriNKET приводило к задержке прогрессирования опухоли по сравнению с группой, получавшей изотип. Около  $2 \times 10^5$  B16F10 клеток меланомы инъецировали подкожно в бок мышей C57BL/6. На 6 день после инокуляции мышей рандомизировали ( $n=10$  на группу). Мышам вводили внутривенно (фиг. 60А) контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 и моноклональное антитело к Tgp-1 мыши или (фиг. 60В) контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 и mcFAE-C26.99 TriNKET, в дозе 150 мкг (6, 8, 10, 12, 14, 16 и 21 дни). Рост опухоли оценивали в течение 28 дней. Графики демонстрируют кривые роста опухоли у отдельных мышей.

В дополнение к модели подкожной опухоли B16F10, mcFAE-C26.99 TriNKET был также протестирован на его эффективность опухоли в условиях диссеминированной опухоли.  $1 \times 10^5$  клеток B16F10 вводили мышам внутривенно. Лечение начинали либо на 4, либо на 7 день с низкой (300 мкг/инъекция) и высокой (600 мкг/инъекция) дозы антитела. На 18 день после инокуляции были подсчитаны метастазы в легких. Лечение, начатое на 4 и 7 день после инокуляции опухоли, привело к уменьшению количества метастаз в легких, когда моноклональное антитело TA99 или mcFAE-C26.99 TriNKET использовалось в высокой концентрации по сравнению с контрольной группой, получавшей изотип. При низких концентрациях только mcFAE-C26.99 TriNKET уменьшал опухолевую нагрузку (фиг. 61А). Подобные эффекты наблюдались, когда антитела вводили, начиная с 7-го дня после инокуляции опухоли. В целом, терапия mcFAE-C26.99 TriNKET привела к снижению количества метастаз в легких по сравнению с моноклональным антителом TA99 во всех тестируемых условиях. Около  $1 \times 10^5$  клеток меланомы B16F10 вводили внутривенно в хвостовую вену мышам C57BL/6 ( $n=8$  на группу). Мышей либо оставляли необработанными, либо внутривенно вводили контрольное моноклональное антитело (изотип, клон C1.18.4), моноклональное антитело TA99 или TriNKET TA99 (mcFAE-C26.99). На фиг. 61А продемонстрирована опухолевая нагрузка, когда антитела вводили в дозе 150 мкг (4, 6, 8, 11, 13, 15 дни). Фиг. 61В показывает опухолевую нагрузку, когда антитела вводили в дозе 150 мкг (7, 9, 11, 13, 15 дни). Через 18 дней после введения опухоли мышей умерщвляли и оценивали количество метастаз на поверхности легких (фиг. 61В).

#### Пример 17. Комбинированная терапия с mcFAE-C26.99 TriNKET in vivo

Определяли уровни противоопухолевого ответа мультиспецифических белков по настоящему изобретению при объединении с другим противоопухолевым агентом. Чтобы определить, могут ли быть усилены противоопухолевые иммунные ответы, опосредованные mcFAE-C26.99, были проведены комбинированные исследования с использованием антител к PD-1 или цитокинов IL-2. Мышам C57BL/6 вводили подкожно  $2 \times 10^5$  клеток опухоли B16F10. Мышам вводили контрольный изотип, mcFAE-C26.99 TriNKET, моноклональное антитело к PD-1 или комбинацию mcFAE-C26.99 и моноклонального антитела к PD-1. Монотерапия mcFAE-C26.99 или антителом к PD-1 привела к 10% респондеров. Однако комбинированная терапия mcFAE-C26.99 и моноклональным антителом к PD-1 задержала прогрессирование опухоли и привела к 40% мышей-респондеров по сравнению с группой, получавшей изотип.

#### Комбинированная терапия с моноклональным антителом к PD-1

$2 \times 10^5$  B16F10 клеток меланомы вводили подкожно в бок мышей C57BL/6. На 6 день после инокулирования опухоли мышей рандомизировали ( $n=10$  на группу). Мышам вводили внутривенно контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 с моноклональным антителом к IgG2a 2A3 крысы и mcFAE-C26.99; контрольный изотип и клон моноклонального антитела к PD-1 RPM1-14; или комбинацию mcFAE-C26.99 и моноклональное антитело к PD-1. Животным вводили, как указано выше, однократные дозы 150 мкг (mcFAE-C26.99 и C1.18.4) и 200 мкг (моноклональное антитело к PD-1 и 2A3). Рост опухоли оценивали в течение 30 дней. Графики на фиг. 66А-66С показывают кривые роста опухоли у отдельных мышей. На фиг. 66А представлены линейные графики, показывающие размер опухоли ( $\text{мм}^3$ ) у мышей, которым внутривенно вводили контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 с моноклональным антителом к IgG2a 2A3 крысы или mcFAE-C26.99. На фиг. 66В представлены линейные графики, показывающие размер опухоли ( $\text{мм}^3$ ) у мышей, которым внутривенно вводили контрольный изотип или моноклональное антитело к PD-1, клон RPM1-14. На фиг. 66С представлены линейные графики, показывающие размер опухоли ( $\text{мм}^3$ ) у мышей, которым внутривенно вводили комбинацию mcFAE-C26.99 и моноклонального антитела к PD-1.

#### Комбинированная терапия с IL-2

Также оценивали влияние на размер опухоли при введении комбинации mcFAE-C26.99 и рекомбинантного IL-2 человека. Мышам C57BL/6 вводили подкожно  $2 \times 10^5$  клеток опухоли B16F10. Мышам вводили контрольный изотип, mcFAE-C26.99 TriNKET или IL-2 по отдельности, или обрабатывали комбинацией mcFAE-C26.99 и IL-2. Монотерапия mcFAE-C26.99 (фиг. 67А) или IL-2 (фиг. 67В) привела к 10% мышей-респондеров. Однако комбинированная терапия (фиг. 67С) задержала прогрессирование опухоли и привела к 70-90% мышей-респондеров по сравнению с группой, получавшей изотип.

Для этого эксперимента  $2 \times 10^5$  клеток меланомы B16F10 инъецировали подкожно в бок мышей

C57BL/6. На 6 день после инокулирования опухоли мышей рандомизировали (n=10 на группу). Мышам внутрибрюшинно вводили контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 или mcFAE-C26.99; контрольный изотип или IL-2; или комбинацию mcFAE-C26.99 и IL-2. Животным вводили, как указано выше, однократные дозы 150 мкг (mcFAE-C26.99 и C1.18.4) и 100000 ЕД (IL-2, два раза в день). Рост опухоли оценивали в течение 40 дней у 3 мышей из комбинированной группы, оставшихся без опухолей. Графики демонстрируют кривые роста опухоли у отдельных мышей.

На фиг. 67А представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 или mcFAE-C26.99. На фиг. 67В представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили контрольный изотип или IL-2. На фиг. 67С представлены линейные графики, показывающие размер опухоли (мм<sup>3</sup>) у мышей, которым внутрибрюшинно вводили комбинацию mcFAE-C26.99 и IL-2.

Пример 18. Цитотоксическая активность покоящихся NK-клеток человека, опосредованную TriNKET, моноклональными антителами или биспецифическими антителами к HER2-положительным клеткам

PBMC выделяли из лейкоцитомбоцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Изолированные PBMC были промыты и подготовлены для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли, используя метод отрицательного отбора с магнитными бусами; чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки культивировали в среде, содержащей 100 нг/мл IL-2, или оставляли на ночь без цитокина. Активированные IL-2 или покоящиеся NK-клетки использовали на следующий день в анализах цитотоксичности.

#### Анализ цитотоксичности DELFIA

Линии клеток рака человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры, клетки промывали HBS и ресуспендировали в среде роста при 10<sup>6</sup> клеток/мл для мечения BATDA реагентом (Perkin Elmer AD0116). Следовали инструкциям производителя по мечению клеток-мишеней. После мечения клетки промывали 3 раза HBS и ресуспендировали в 0,5-1,0×10<sup>5</sup> клеток/мл в культуральной среде. Для приготовления фоновых лунок аликвоту меченых клеток отбирали, и клетки извлекали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторениях, чтобы не повредить гранулированные клетки. 100 мкл BATDA-меченных клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Лунки были сохранены для спонтанного высвобождения из клеток-мишеней, и лунки были подготовлены для максимального лизиса клеток-мишеней путем добавления 1% Тритон-Х. Моноклональные антитела или TriNKET против интересующей опухоли-мишени разводили в культуральной среде и в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенного mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали при 10 - 2,0×10<sup>6</sup> клеток/мл в культуральной среде в зависимости от желаемого Е:Т соотношения. 50 мкл NK-клеток добавляли в каждую лунку планшета, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> за 2-3 ч до проявления теста.

После культивирования в течение 2-3 ч планшет извлекали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 15 мин. Планшет считывали с использованием инструментов Victor 3 или SpectraMax i3X. %

Удельного лизиса рассчитывали следующим образом: % Удельного лизиса = ((Экспериментальное высвобождение-спонтанное высвобождение)/(Максимальное высвобождение-Спонтанное высвобождение))\*100%.

#### Комбинация моноклонального антитела и биспецифического NK-клеточного рекрутера не повторяет активность TriNKET

Фиг. 68 показывает цитотоксическую активность покоящихся NK-клеток человека, опосредованную TriNKET, моноклональными антителами или биспецифическими антителами к HER2-положительной линии клеток Colo-201. TriNKET (ADI-29404 (F04)), нацеленный на HER2, индуцировал максимальный лизис клеток Colo-201 покоящимися NK-клетками человека. Мутация D265A была введена в домен CH2TriNKET для нивелирования связывания с FcR. HER2-TriNKET (ADI-29404 (F04))-D265A не способен опосредовать лизис клеток Colo-201, демонстрируя важность двойного нацеливания CD16 и NKG2D на NK-клетки. Чтобы дополнительно продемонстрировать важность двойного нацеливания на NK-клетки, моноклональное антитело трастузумаб использовали для нацеливания на HER2 и опосредования ADCC с помощью NK-клеток. Один трастузумаб был способен увеличивать лизис NK-клетками клеток Colo-201, но максимальный лизис, достигнутый одним только трастузумабом, был около в 4 раза ниже по сравнению с таковым в присутствии TriNKET. Чтобы понять важность нацеливания CD16 и NKG2D на одну и ту же молекулу, активность TriNKET (ADI-29404 (F04)) сравнивали с активностью биспецифического антитела, направленного на HER2 и NKG2D, в комбинации с трастузумабом. При использовании в эквивалентных концентрациях комбинация биспецифической молекулы и трастузумаба

не способна обеспечить максимальный лизис клеток Colo-201 покоящимися НК-клетками человека. Недостаток комбинации трастузумаб+биспецифическая молекула демонстрирует важность содержания триспецифического связывания TriNKET в одной молекуле.

Пример 19.

Пример 14 демонстрирует, что HER2-, CD33- и BCMA-TriNKET усиливают цитотоксичность покоящихся и активированных IL-2 НК-клеток человека. Этот пример дополнительно характеризует влияние TriNKET на IL-12- и IL-15-активированные НК-клетки человека. Цитотоксичность измеряли в контексте трех различных опухоль-ассоциированных антигенов, HER2, CD33 и BCMA, с НК-клетками, выделенными из PBMC человека, с использованием анализа цитотоксичности DELFIA, как описано в примере 14.

Чтобы измерить цитотоксичность в отношении HER2-экспрессирующих клеток, НК-клетки человека культивировали с IL-2, IL-12 или IL-15 или оставляли на ночь без цитокинов. Покоящиеся или активированные цитокинами НК-клетки совместно культивировали с опухолевыми клетками 786-О с низким уровнем экспрессии HER2 в присутствии серийно разведенного трастузумаба или полученного из трастузумаба HER2-TriNKET. Как показано на фиг. 73А, покоящиеся НК-клетки человека не показали уничтожения клеток-мишеней 786-О, и трастузумаб не смог увеличить лизис клеток-мишеней 786-О. HER2-TriNKET был способен увеличивать лизис покоящимися НК-клетками клеток-мишеней 786-О, но лизис достигал только около 20%. Как показано на фиг. 73В-D, цитокин-активированные НК-клетки показали около 20% специфического лизиса при совместном культивировании с клетками-мишенями 786-О. В отличие от покоящихся НК-клеток трастузумаб способен увеличивать активность НК-клеток, активированных цитокинами, около до 40% специфического лизиса. HER2-TriNKET более мощно усиливает цитокин-активированный лизис НК-клетками клеток-мишеней 786-О. Специфический лизис также достигал более высокого максимального значения с HER2-TriNKET по сравнению с трастузумабом с активированными цитокинами НК-эффекторными клетками.

Чтобы измерить цитотоксичность в отношении CD33-экспрессирующих клеток, НК-клетки человека культивировали с IL-2, IL-12 или IL-15 или оставляли на ночь без цитокинов. Покоящиеся или активированные цитокинами НК-клетки совместно культивировали с CD33-положительными Molm-13 клетками опухоли в присутствии серийно разведенных линтузумаба, запатентованного моноклонального антитела к CD33 или CD33-TriNKET, полученного из запатентованного антитела к CD33. Как показано на фиг. 74А, покоящиеся НК-клетки человека не показали уничтожения клеток-мишеней Molm-13, и оба моноклональных антитела привели только к небольшому увеличению лизиса НК-клетками клеток-мишеней Molm-13. Как показано на фиг. 74В-D, CD33-TriNKET был способен увеличивать лизис покоящимися НК-клетками клеток-мишеней Molm-13 до около 30% специфического лизиса. Активированные цитокинами НК-клетки показали около 35-55% лизиса при совместном культивировании с клетками-мишенями Molm-13. В отличие от покоящихся НК-клеток, оба моноклональных антитела были способны повышать активность НК-клеток, активированных цитокинами, до около 60-70% специфического лизиса. CD33-TriNKET более эффективно усиливает цитокин-активированный лизис НК-клетками клеток-мишеней Molm-13. Специфический лизис также достигал более высокого максимального значения с CD33-TriNKET по сравнению с любым моноклональным антителом с активированными цитокинами НК-эффекторными клетками.

Для измерения цитотоксичности в отношении клеток, экспрессирующих BCMA, НК-клетки человека культивировали с IL-2, IL-12 или IL-15 или оставляли на ночь без цитокинов. Покоящиеся или активированные цитокинами НК-клетки совместно культивировали с BCMA-положительными KMS12-PE клетками опухоли в присутствии серийно разведенных антител к BCMA EM-901 или BCMA-TriNKET, полученных из EM-901. Как показано на фиг. 75А, покоящиеся НК-клетки человека не показали уничтожения клеток-мишеней KMS12-PE, а EM-901 и BCMA-TriNKET показали лишь небольшое увеличение лизиса НК-клетками клеток-мишеней KMS12-PE. Как показано на фиг. 75В-D, НК-клетки, активированные цитокинами, показали около 10-40% лизиса при совместном культивировании с клетками-мишенями KMS12-PE, причем степень лизиса варьируется для НК-клеток, обработанных различными цитокинами. В отличие от покоящихся НК-клеток, EM-901 был способен увеличивать активность НК-клеток, активированных цитокинами, до около 40-80% специфического лизиса в зависимости от используемого цитокина. BCMA-TriNKET более эффективно усиливает цитокин-активированный лизис НК-клетками клеток-мишеней KMS12-PE. Специфический лизис также достигал более высокого максимального значения с BCMA-TriNKET по сравнению с родительским моноклональным антителом с активированными цитокинами НК-эффекторными клетками.

Помалидомид представляет собою соединение, обладающее иммуномодулирующей активностью. Чтобы оценить влияние помалидомида и/или IL-2 на цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток, экспрессирующих BCMA, НК-клетки человека отделяли или культивировали с IL-2, помалидомидом или комбинацией IL-2 и помалидомида в течение ночи. Покоящиеся или активированные НК-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями KMS12-PE в присутствии серийно разведенных EM-901 или BCMA-TriNKET, полученных из EM-901. Как показано на фиг. 76А, покоящиеся НК-клетки человека не показали уничтожения клеток-мишеней KMS12-PE. EM-901 показало только небольшое увеличение лизиса НК-клетками клеток-мишеней KMS12-PE, тогда как BCMA-TriNKET продемонстрировал более

высокий и более сильный специфический лизис. Как показано на фиг. 76В, активированные помалидомидом НК-клетки показали лизис клеток-мишеней KMS12-PE, сходный с покоящимися НК-клетками. ВСМА-TriNKET увеличивал лизис клеток-мишеней НК-клетками, активированными помалидомидом, в большей степени, чем увеличение лизиса покоящимися НК-клетками. Как показано на фиг. 76С, IL-2-активированные НК-клетки лизировали около 20% клеток-мишеней в совместной культуре. EM-901 увеличило лизис НК-клетками клеток-мишеней KMS12-PE до около 40%, тогда как ВСМА-TriNKET увеличил специфический лизис до около 60%. Следовательно, НК-клетки были более активными после обработки IL-2 по сравнению с обработкой помалидомидом. Когда IL-2 и помалидомид объединяются для активации НК-клеток, НК-клетки демонстрируют еще более высокую активность-около 30% специфического лизиса. EM-901 увеличивало лизис с помощью НК-клеток, активированных IL-2/помалидомидом, до около 60%, а ВСМА-TriNKET увеличивал лизис до около 80%. Этот результат продемонстрировал большую эффективность TriNKET по сравнению с его родительским антителом и согласуется с другими условиями, протестированными в настоящем примере.

#### Пример 20.

Этот пример показывает цитотоксичность CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека против HER2-экспрессирующих клеток-мишеней в присутствии HER2-TriNKET и антитела к PD-1 пембролизумаба.

Вкратце, PBMC человека выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Изолированные PBMC стимулировали с помощью 1 мкг/мл конканавалина А (ConA) при 37°C в течение 18 ч. Затем ConA удаляли и PBMC культивировали с 25 ед./мл IL-2 при 37°C в течение 4 дней. CD8<sup>+</sup> Т-клетки очищали с использованием отрицательного метода отбора с магнитными бусами. Очищенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки культивировали в среде, содержащей 10 нг/мл IL-15 при 37°C в течение 3-14 дней.

Была оценена чистота клеточной популяции, а также экспрессия NKG2D, CD16 и PD-1. Вкратце, клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором антителами к CD3, CD8, CD56, CD4, NKG2D и CD16 и анализировали проточной цитометрией. Как показано на фиг. 77А, CD8<sup>+</sup> Т-клетки были высокой степени чистоты. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетки были равномерно положительными на NKG2D и отрицательными на CD16. Около 20% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток экспрессировали PD-1.

В качестве клеток-мишеней использовали линию HCC1954 клеток рака человека, которая экспрессировала HER2, трансдуцированную VacMam 3.0 NucLight Green (# 4622) для отслеживания клеток. Клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором антителами к HER2 и PD-L1, и уровень экспрессии HER2 и PD-L1 анализировали проточной цитометрией. Как показано на фиг. 77В, экспрессия HER2 и PD-L1 была обнаружена на поверхности клеток HCC1954.

Эффект HER2-TriNKET, пембролизумаба, и их комбинации на цитотоксичность Т-клеток оценивали с использованием долгосрочного анализа цитотоксичности CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Вкратце, клетки-мишени HCC1954 собирали из культуры, промывали, ресуспендировали в питательной среде и вводили в планшет при 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. HER2-TriNKET, пембролизумаб и соответствующие им контрольные изотипы разводили в культуральных средах. 50 мкл антител и TriNKET вместе добавляли в каждую лунку. CD8<sup>+</sup> эффекторные Т-клетки собирали из культуры, промывали и ресуспендировали при 1×10<sup>6</sup> клеток/мл (для Е: Т соотношения 10:1) или 2,5×10<sup>6</sup> клеток/мл (для Е:Т соотношения 25:1) в питательных средах. 50 мкл CD8<sup>+</sup> Т-клеток добавляли в каждую лунку планшета, до общего объема культуры 200 мкл в каждой лунке. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> до 7 дней. Изображения в фазовом и зеленом каналах собирали каждый час, по 2 изображения на лунку, используя инструмент IncuCyte S3. Изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения IncuCyte S3. Количество живых опухолевых клеток в лунках было представлено количеством зеленых объектов.

Как показано на фиг. 78А, комбинация 20 нМ HER2-TriNKET и 6,7 нМ, 20 нМ или 67 нМ пембролизумаба показала более сильный эффект уничтожения опухоли, чем HER2-TriNKET или только пембролизумаб. Комбинированный эффект был более значительным при более высоком соотношении Е:Т и увеличенной концентрации пембролизумаба. Подобный комбинированный эффект наблюдался с CD8<sup>+</sup> эффекторными Т-клетками, выделенными от другого донора, когда HER2-TriNKET был использован при низкой дозе 0,04 нМ и пембролизумаб использовали при 67 нМ (фиг. 78В).

#### Пример 21.

В этом примере показана цитотоксичность PBMC человека в отношении экспрессирующей HER2 линии клеток рака молочной железы человека Skbr-3 в присутствии HER2-TriNKET и агониста TLR (In-vivogen TL8-506).

Вкратце, клетки Skbr-3 трансдуцировали для стабильной экспрессии NucLight Green (Essen BioScience 4475). После отбора пуromицином клетки собирали из культуры и ресуспендировали в культуральной среде. 3×10<sup>3</sup> клеток-мишеней добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном в 100 мкл среды. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 20 ч.

50 мкл HER2-TriNKET и/или агониста TLR, разведенного в культуральной среде, добавляли в конечных концентрациях для анализа 10 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно. Свежеобработанные PBMC

человека ресуспендировали при  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде, и 50 мкл РВМС добавляли во все лунки за исключением контрольной группы "только клетки-мишени" (которая получала 50 мкл культуральной среды). Планшет помещали в прибор Incucyte (Essen BioScience) на время анализа, причем фазовые и зеленые флуоресцентные изображения получали ежедневно в течение четырех дней. Количество клеток было получено с использованием масок зеленых событий с минимальными ограничениями площади для исключения дебриса. Количество клеток в каждый момент времени было нормализовано к количеству начальных зеленых клеток SKBR-3 для получения процента роста.

Как показано на фиг. 79, добавление только РВМС человека не оказывало влияния на пролиферацию клеток-мишеней SKBR-3, но одновременное включение HER2-TriNKET в культуру позволило РВМС существенно ингибировать рост опухолевых клеток. В тестируемой дозе агонист TLR стимулировал РВМС медленно уменьшать популяцию клеток SKBR-3 по сравнению с первоначальным количеством. Комбинация HER2-TriNKET и агониста TLR была наиболее сильной, способствуя уничтожению почти всех клеток-мишеней в течение 4 дней.

Пример 22.

Пример 17 демонстрирует, что mcFAE-C26.99 TriNKET подавлял рост опухоли отдельно или в комбинации с IL-2 или с моноклональным антителом к PD-1 в ксенотрансплантантной модели мыши с опухолевыми клетками B16F10. Этот пример дополнительно характеризует комбинацию mcFAE-C26.99 TriNKET с IL-12.

Вкратце,  $2 \times 10^5$  клеток меланомы B16F10 инъецировали подкожно в бок мышей C57BL/6. На 5 день после инокулирования опухоли мышей рандомизировали ( $n=10$  на группу). Мышам внутривенно вводили (A) 7,5 мг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET или 7,5 мг/кг контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4, (B) 1 мкг рекомбинантного IL-12 мыши (rmIL-12) или 7,5 мг/кг контрольный изотип моноклонального антитела к IgG2a мыши C1.18.4 или (C) комбинацию 7,5 мкг/кг mcFAE-C26.99 TriNKET и 1 мкг rmIL-12. Рост опухоли оценивали в течение 61 дня, а выживаемость мышей контролировали.

Как показано на фиг. 80A-C, монотерапия mcFAE-C26.99 TriNKET (фиг. 80A) или IL-12 мыши (фиг. 80B) сама по себе была эффективной в подавлении роста опухоли B16F10, но комбинированная терапия mcFAE-C26.99 TriNKET и IL-12 (фиг. 80C) оказывала более существенный эффект, приводя к полной регрессии опухоли у 40% обработанных мышей. Как показано на фиг. 81, общая выживаемость была значительно увеличена с помощью комбинированной терапии: 70% мышей, получавших комбинированную терапию, были еще живы на 61 день, тогда как среднее время выживания составляло только 20 дней в контрольной группе и группе, получавшей TriNKET, и 37 дней в группе лечения одним агентом IL-12.

#### Включение путем ссылки

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

#### Эквиваленты

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

2. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуж-

дающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность определяющей комплементарности области 1 (CDR1), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, последовательность определяющей комплементарности области 2 (CDR2), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и последовательность определяющей комплементарности области 3 (CDR3), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 113; и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93; и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59; и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104; и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

7. Способ по п.3, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103; и переменный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62.

8. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий

вающий участок, который связывается с CD16;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

9. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

10. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91; и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 54, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

11. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 52), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 53); и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 54, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 55), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

12. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

13. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

14. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 64), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 95); и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 67), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68.

15. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 64), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 65); и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 67), и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68.

16. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115.

17. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115.

18. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123; и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121.

19. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит по-

следовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 116, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118; и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121.

20. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125.

21. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из блокатора контрольных точек и цитокина,

причем первый антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125.

22. Способ по п.20 или 21, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130; и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 127, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129.

23. Способ по п.20 или 21, отличающийся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 116, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126; и вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность CDR1, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 127, последовательность CDR2, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128, и последовательность CDR3, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129.

24. Способ прямого или опосредованного усиления клеточной гибели опухолевых клеток, экспрессирующих опухоль-ассоциированный антиген, включающий воздействие на опухолевую клетку и естественную клетку-киллера белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из:

(i) блокатора контрольных точек, выбранного из антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к KIR, антитела к NKG2A, антитела к LAG3 и антитела к TIM3; и

(ii) цитокина, выбранного из IL-2, INF $\alpha$ , IL-21, PEG-IL-2 и гетеродимера IL15/IL15R.

25. Способ лечения рака, экспрессирующего опухоль-ассоциированный антиген, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту белка, содержащего:

(a) первый антигенсвязывающий участок, который связывается с NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий участок, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном; и

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

или состава, содержащего белок;

в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из:

(i) блокатора контрольных точек, выбранного из антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к KIR, антитела к NKG2A, антитела к LAG3 и антитела к TIM3; и

(ii) цитокина, выбранного из IL-2, INF $\alpha$ , IL-21, PEG-IL-2 и гетеродимера IL15/IL15R.

26. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает блокатор контрольных точек, выбранный из антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к KIR, антитела к NKG2A, антитела к LAG3 и антитела к TIM3.

27. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает цитокин, выбранный из L-2, IL-15, IL-12, INF $\alpha$ , IL-21, PEG-IL-2 и гетеродимеров IL15/IL15R.

28. Способ по любому из пп.2-7, 9-11, 13-15, 17-19 и 21-27, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечных стромальных опухолей, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, мелкоклеточного рака легкого, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, рака тимуса, рака щитовидной железы, рака уротелия, видов рака, инфильтруемых миелоидными супрессорными клетками, видов рака с отложением внеклеточного матрикса, видов рака с высоким уровнем реактивной стромы и видов рака с неоангиогенезом.

29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий участок белка связывается с NKG2D у людей, приматов, не являющихся человеком, и грызунов.

30. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи присутствуют в одном и том же полипептиде.

31. Способ по любому из пп.24-29, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что однодоменное антитело представляет собой антитело V<sub>H</sub>N или антитело V<sub>NAR</sub>.

33. Способ по любому из пп.1-30, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.

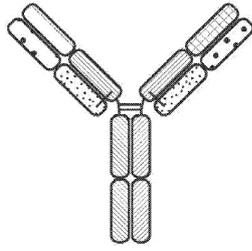
34. Способ по п.33, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий участок представляет собой антитело V<sub>H</sub>N или антитело V<sub>NAR</sub>.

35. Способ по любому из пп.1-34, отличающийся тем, что опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из HER2, EpCAM, CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD-L1.

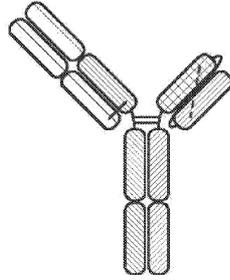
36. Способ по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что белок содержит часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, причем Fc-домен антитела содержит шарнирный домен и домен CH2.

37. Способ по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

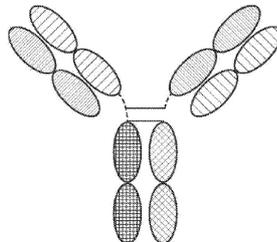
38. Способ по любому из пп.2-7, 9-11, 13-15, 17-19 и 21-37, отличающийся тем, что состав дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.



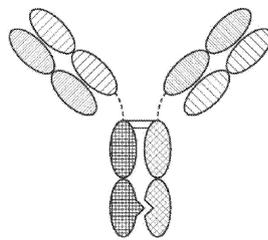
Фиг. 1



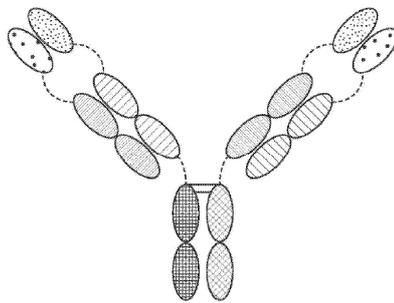
Фиг. 2



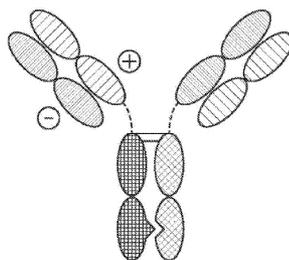
Фиг. 3



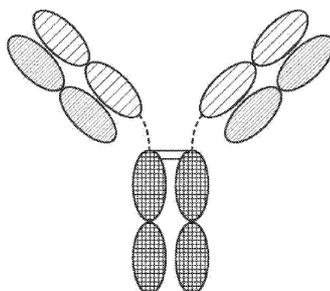
Фиг. 4



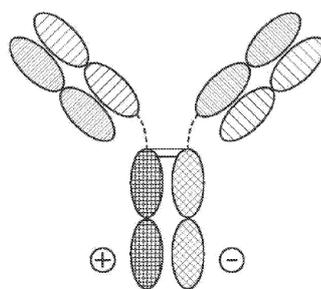
Фиг. 5



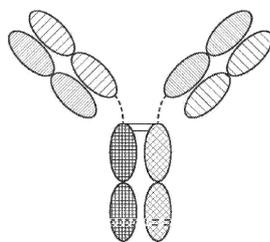
Фиг. 6



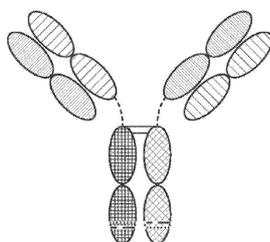
Фиг. 7



Фиг. 8

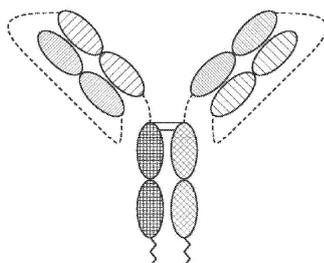


Фиг. 9

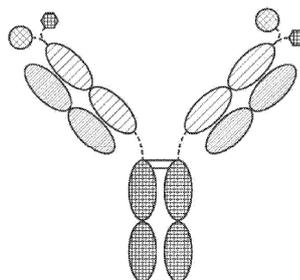


Фиг. 10

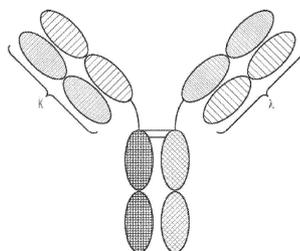
044644



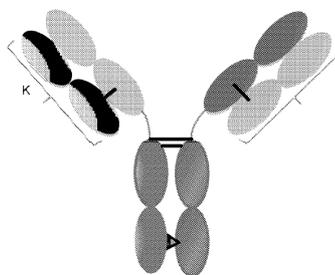
Фиг. 11



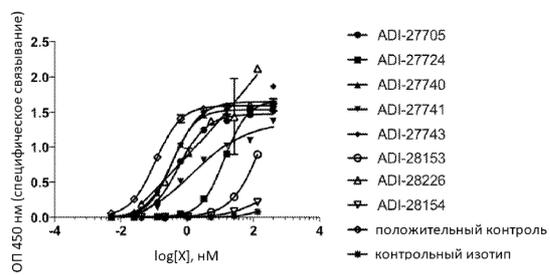
Фиг. 12



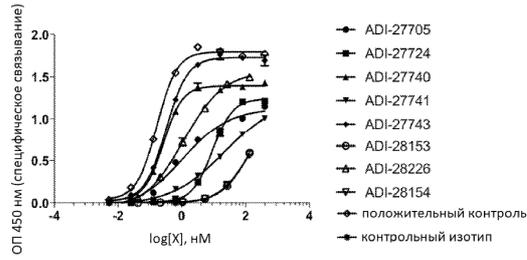
Фиг. 13А



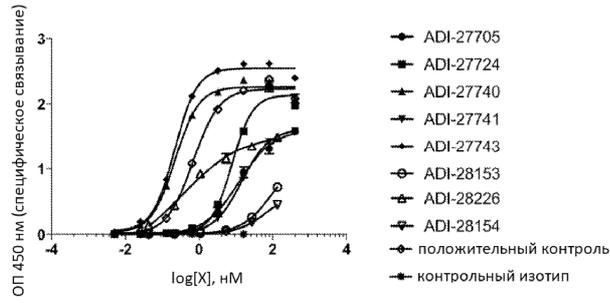
Фиг. 13В



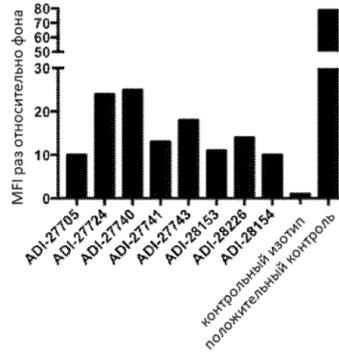
Фиг. 14



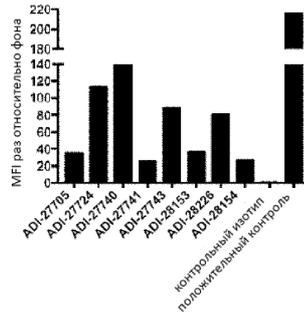
Фиг. 15



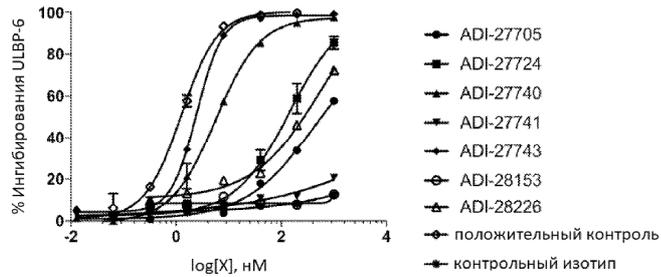
Фиг. 16



Фиг. 17

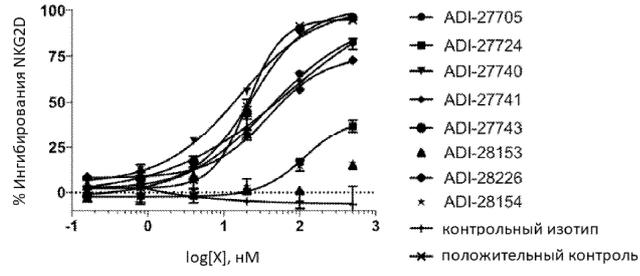


Фиг. 18

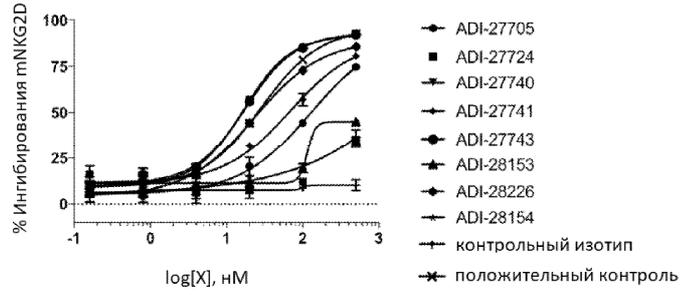


Фиг. 19

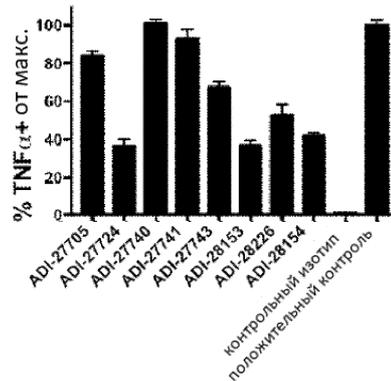
044644



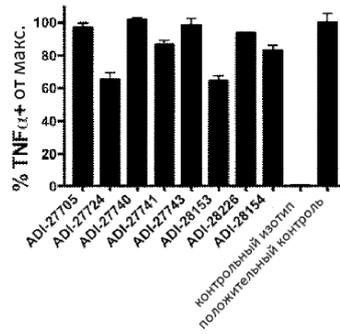
Фиг. 20



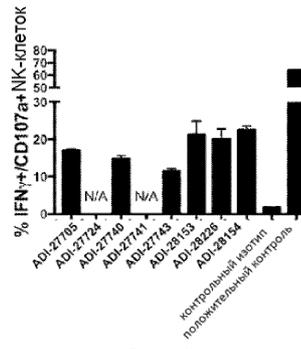
Фиг. 21



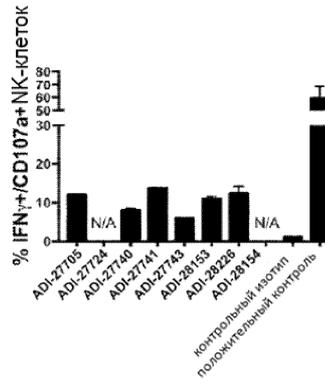
Фиг. 22



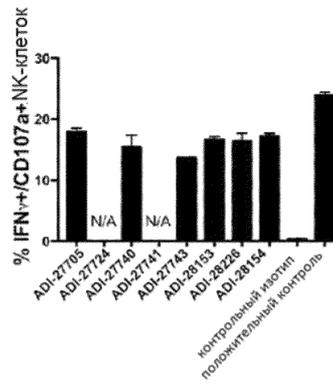
Фиг. 23



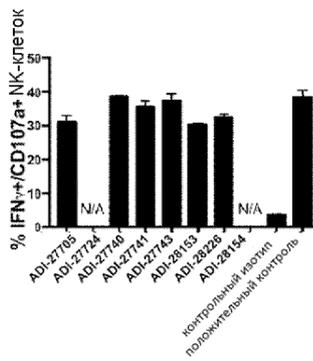
Фиг. 24



Фиг. 25

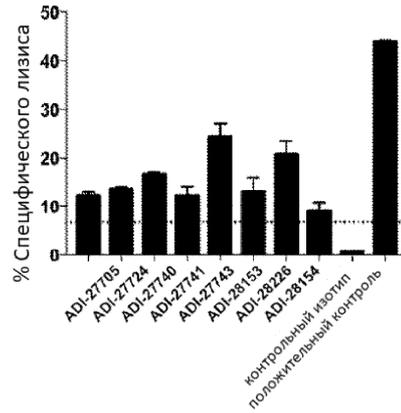


Фиг. 26

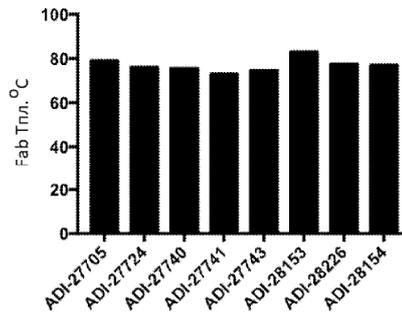


Фиг. 27

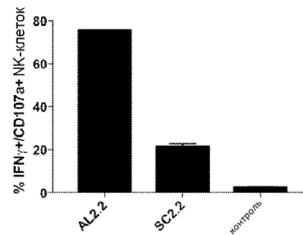
044644



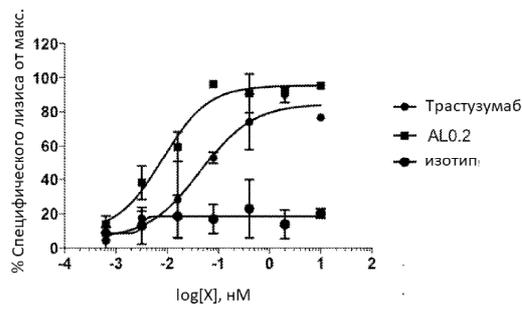
Фиг. 28



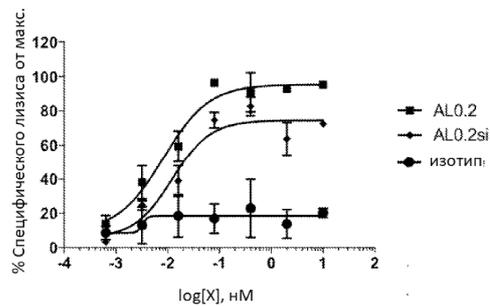
Фиг. 29



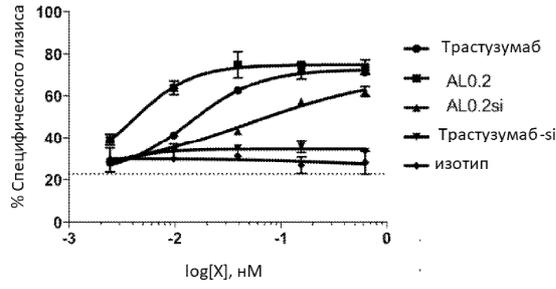
Фиг. 30



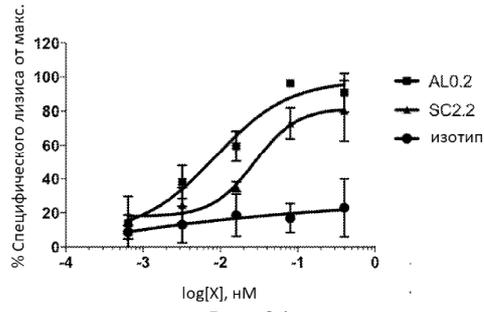
Фиг. 31



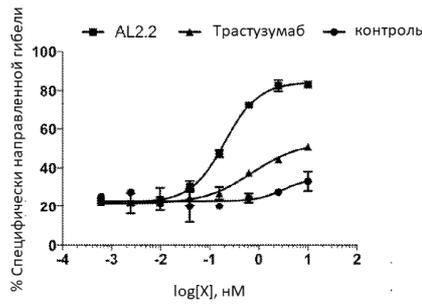
Фиг. 32



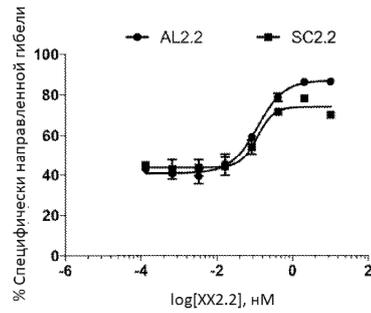
Фиг. 33



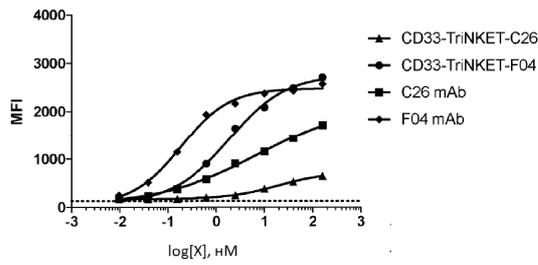
Фиг. 34



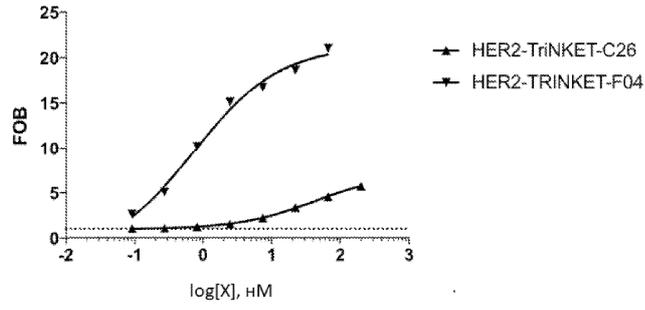
Фиг. 35



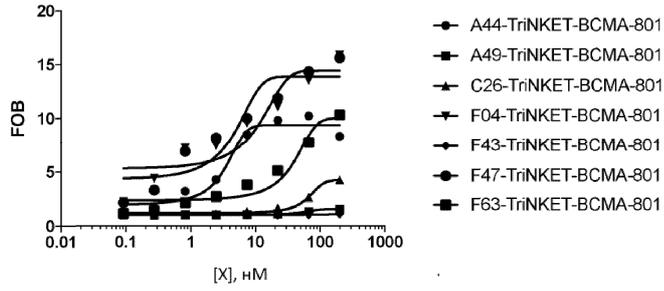
Фиг. 36



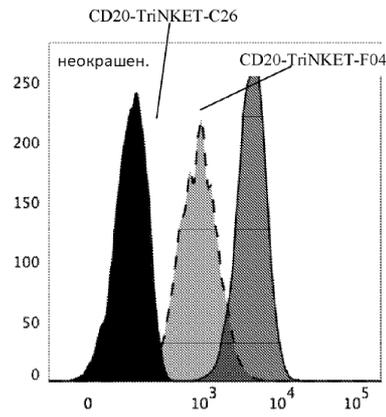
Фиг. 37



Фиг. 38

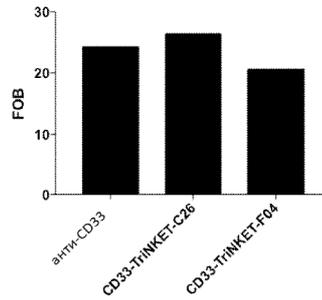


Фиг. 39



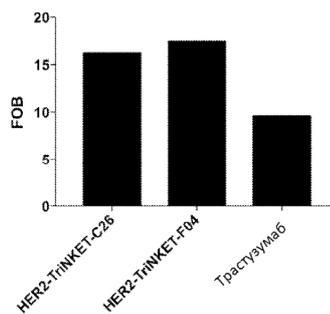
Флуоресценция, измеренная с помощью проточной цитометрии

Фиг. 40

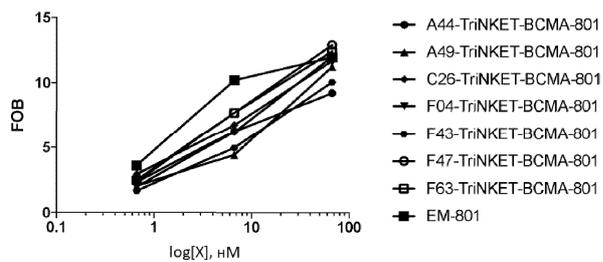


Фиг. 41

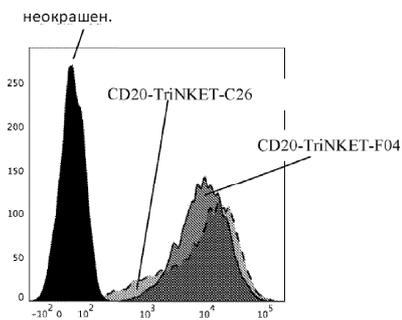
044644



Фиг. 42

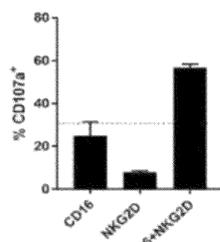


Фиг. 43

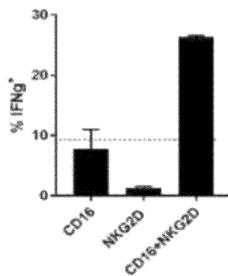


Флуоресценция, измеренная с помощью проточной цитометрии

Фиг. 44

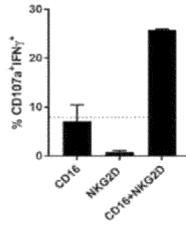


Фиг. 45A

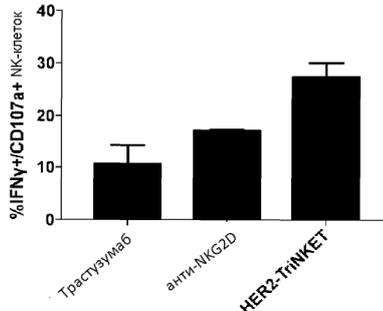


Фиг. 45B

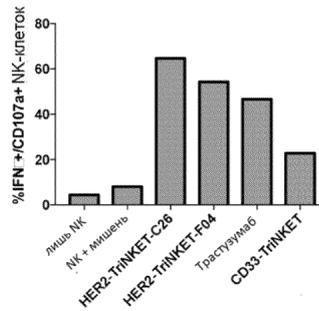
044644



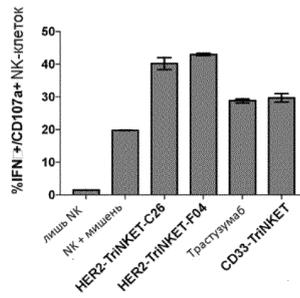
Фиг. 45С



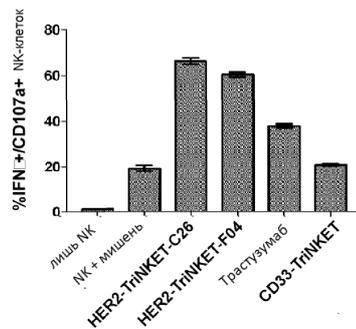
Фиг. 46



Фиг. 47А

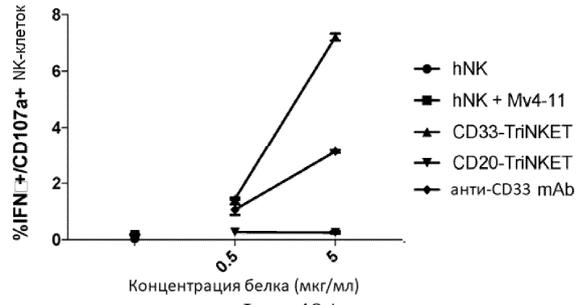


Фиг. 47В

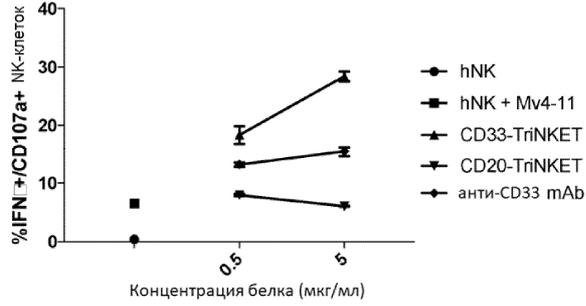


Фиг. 47С

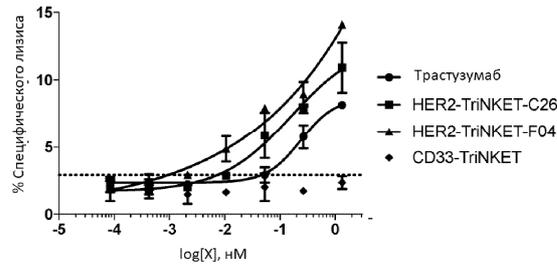
044644



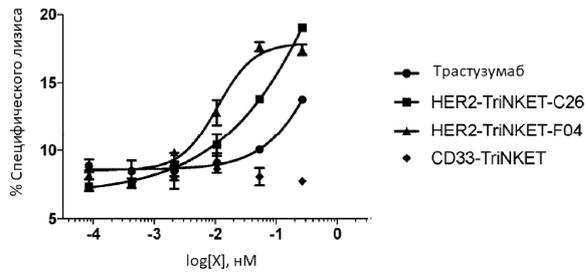
Фиг. 48А



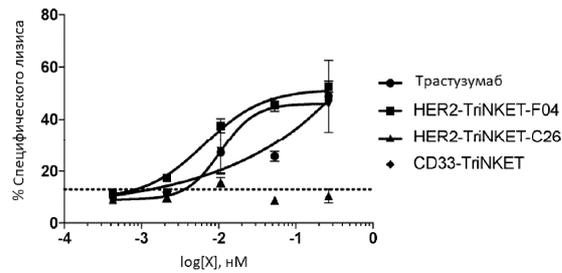
Фиг. 48В



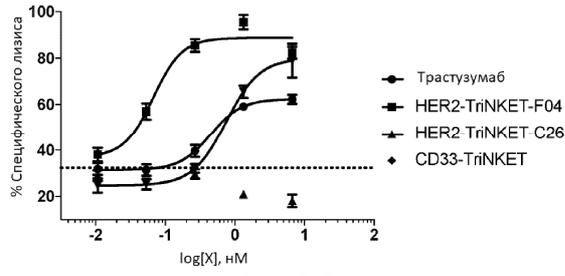
Фиг. 49А



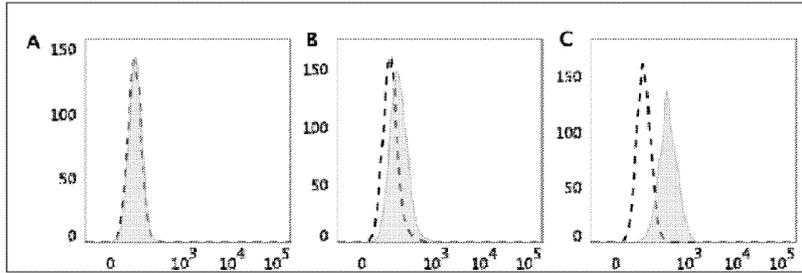
Фиг. 49В



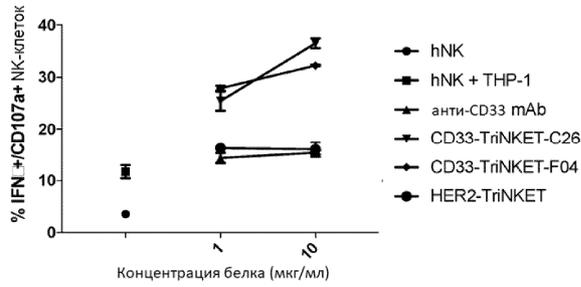
Фиг. 50А



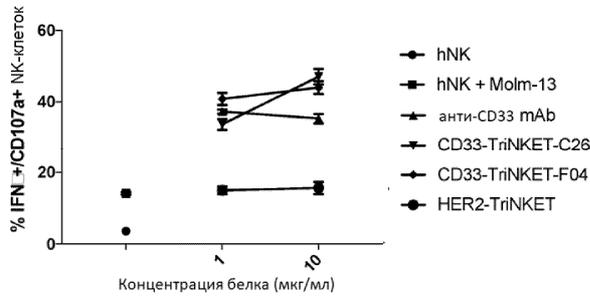
Фиг. 50В



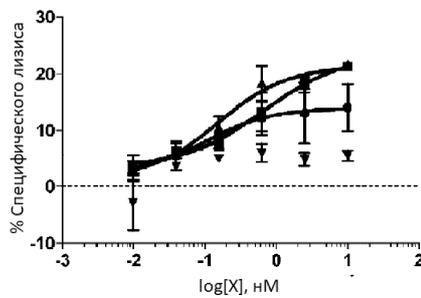
Фиг. 51А-С



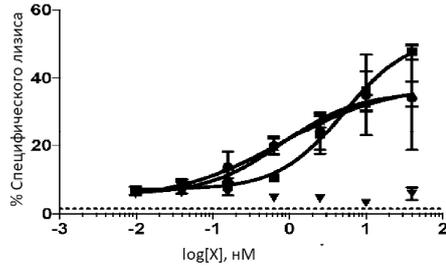
Фиг. 52А



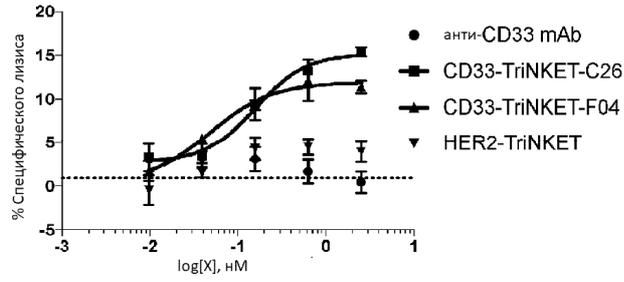
Фиг. 52В



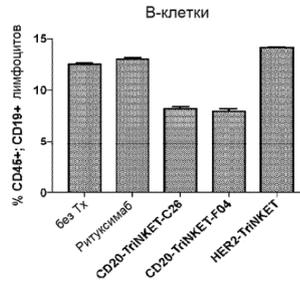
Фиг. 53А



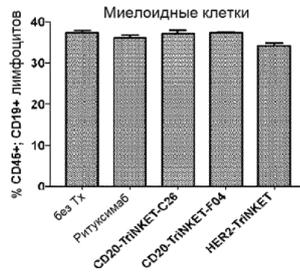
Фиг. 53В



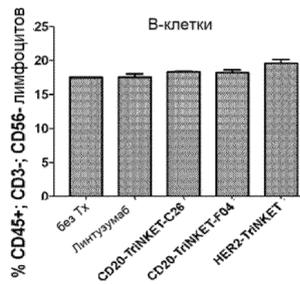
Фиг. 53С



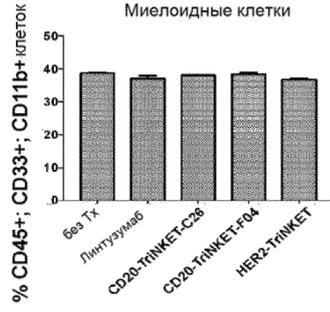
Фиг. 54А



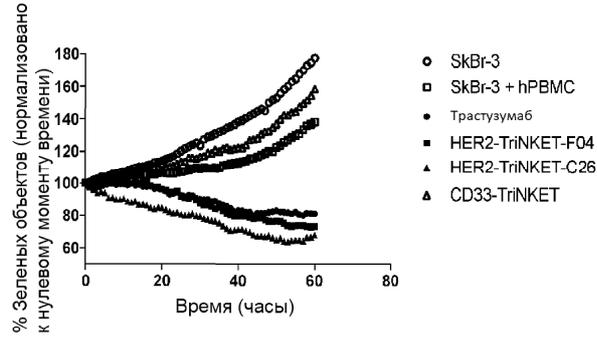
Фиг. 54В



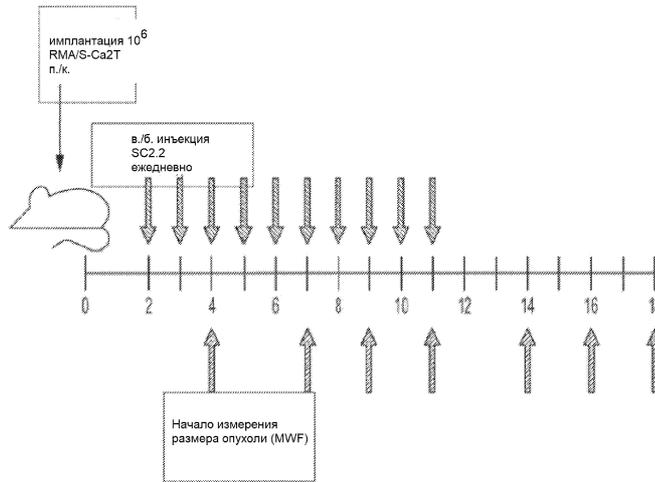
Фиг. 54С



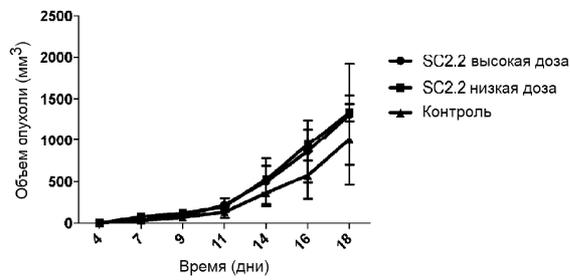
Фиг. 54D



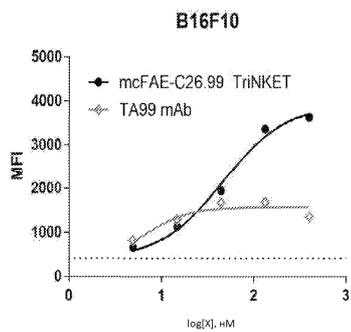
Фиг. 55



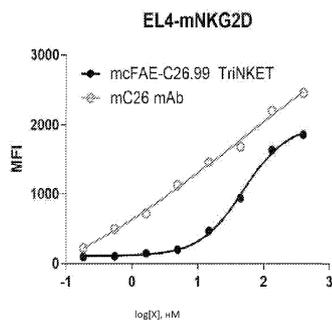
Фиг. 56



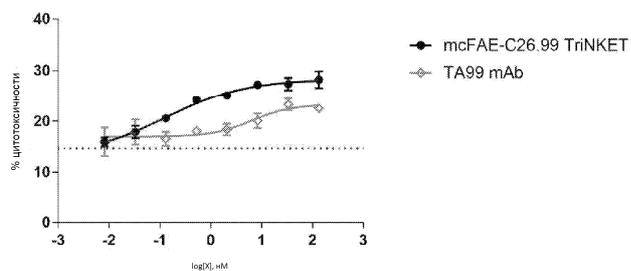
Фиг. 57



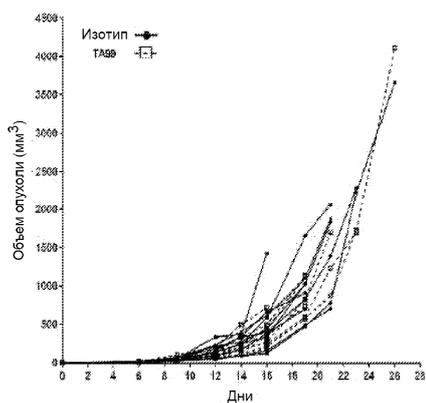
Фиг. 58А



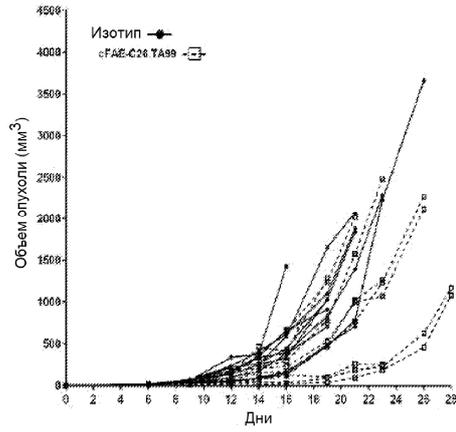
Фиг. 58В



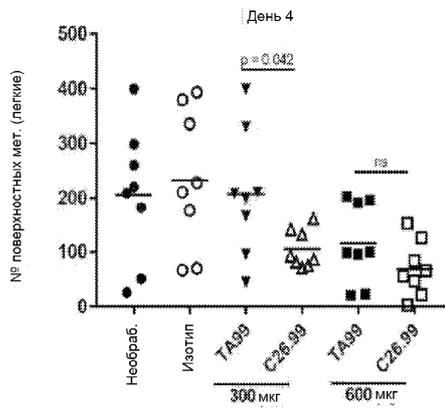
Фиг. 59



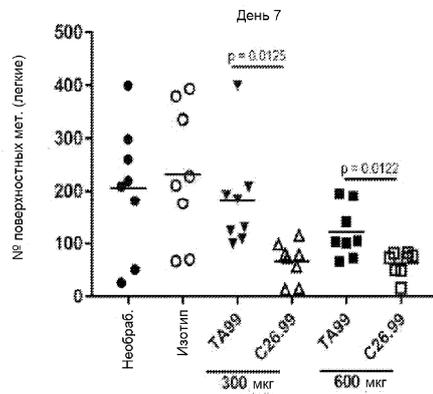
Фиг. 60А



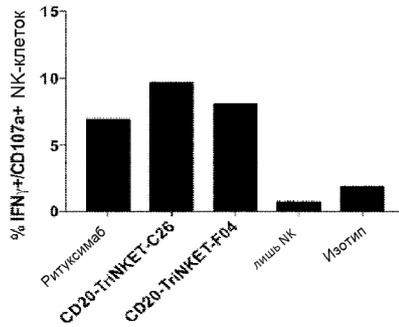
Фиг. 60В



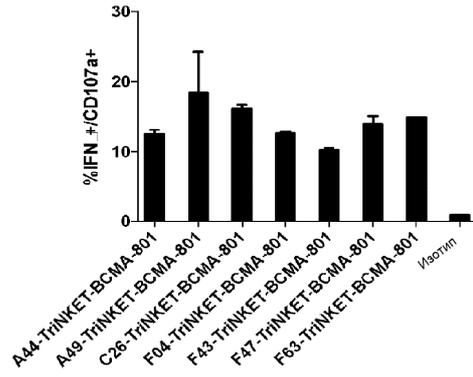
Фиг. 61А



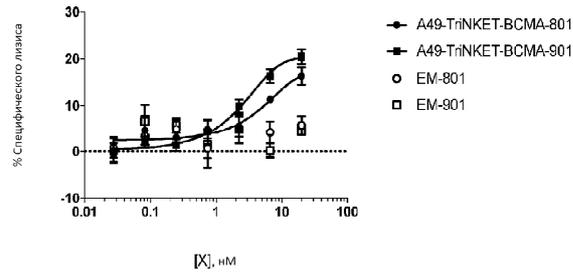
Фиг. 61В



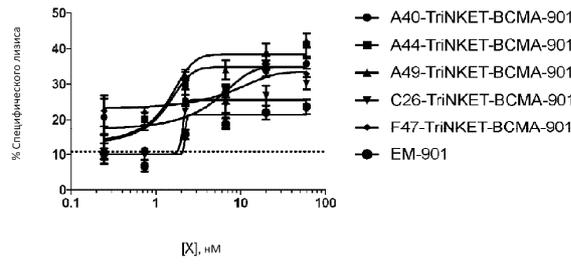
Фиг. 62



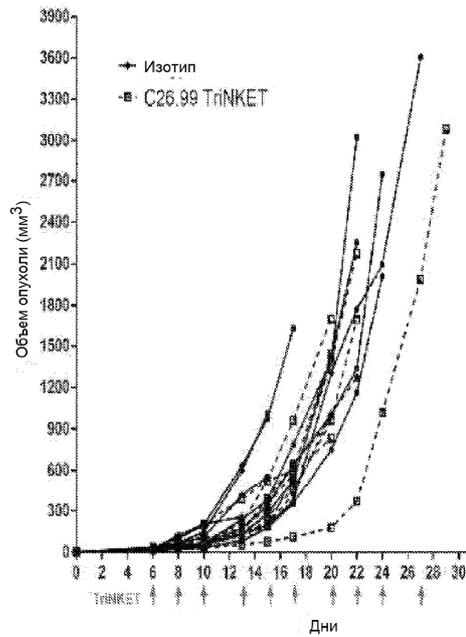
Фиг. 63



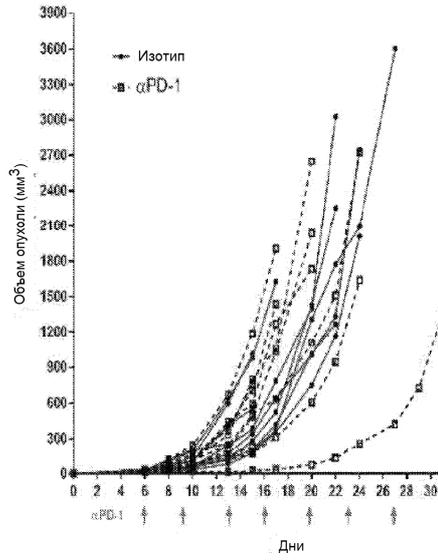
Фиг. 64



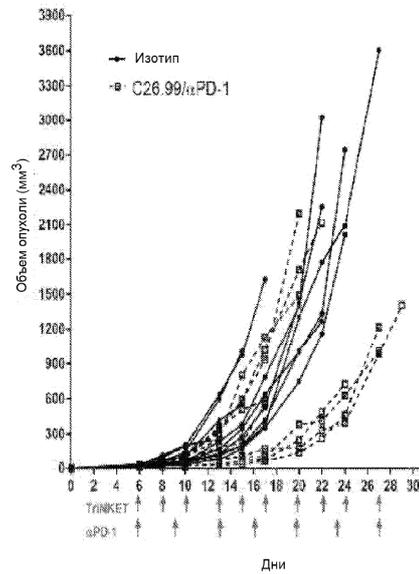
Фиг. 65



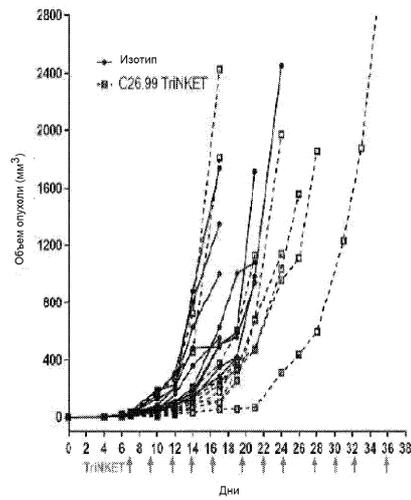
Фиг. 66А



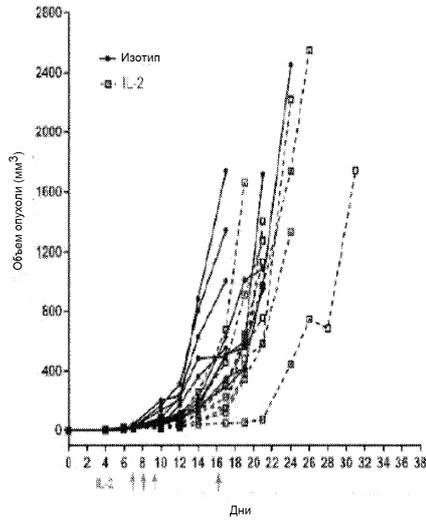
Фиг. 66В



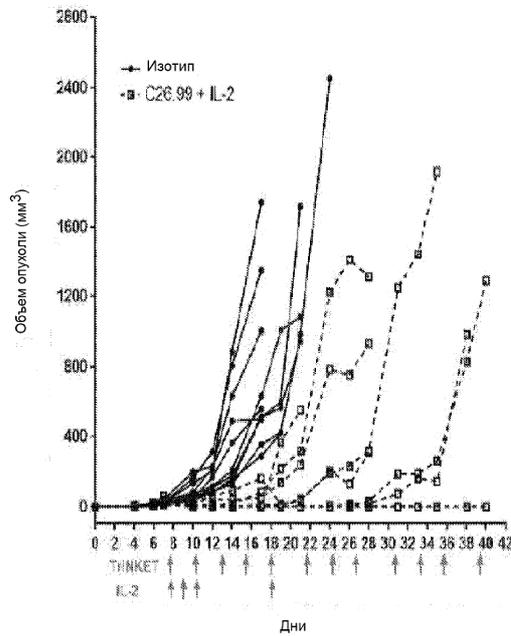
Фиг. 66С



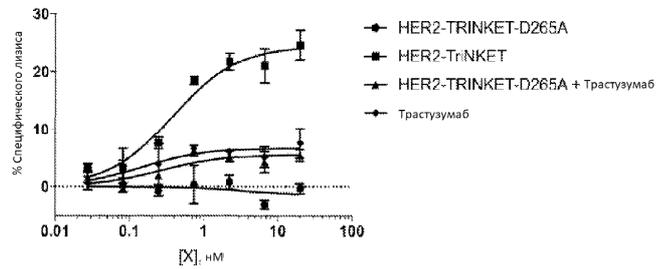
Фиг. 67А



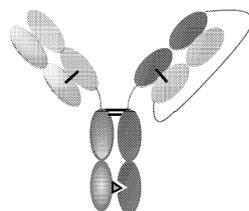
Фиг. 67В



Фиг. 67С

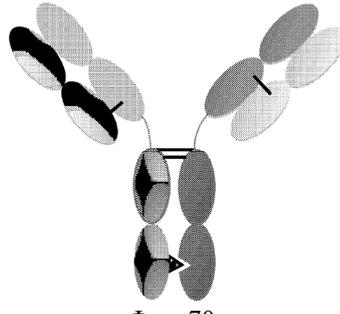


Фиг. 68

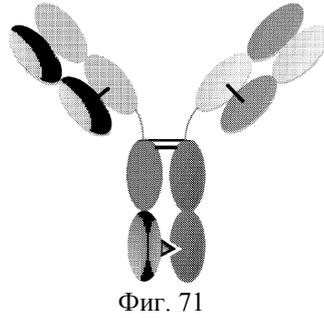


Фиг. 69

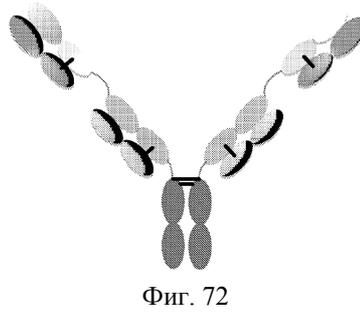
044644



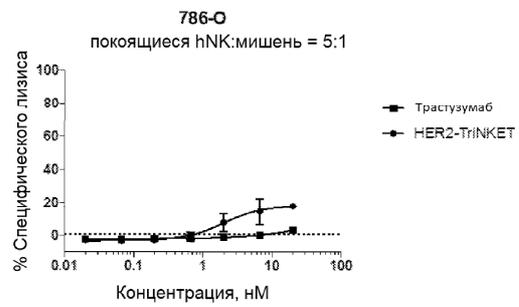
Фиг. 70



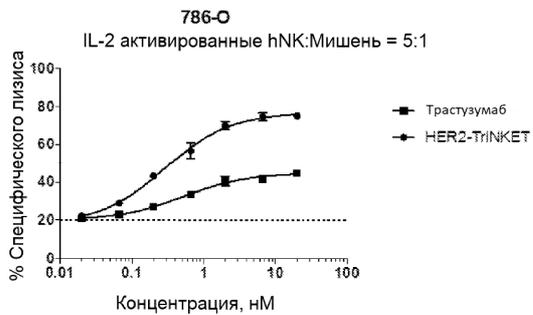
Фиг. 71



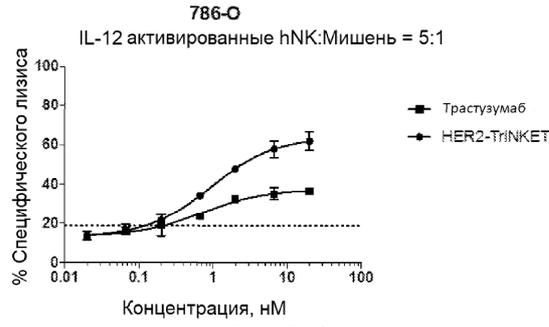
Фиг. 72



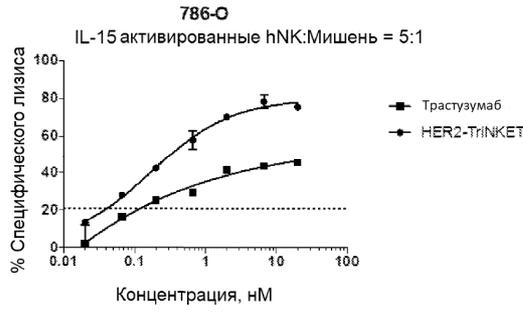
Фиг. 73А



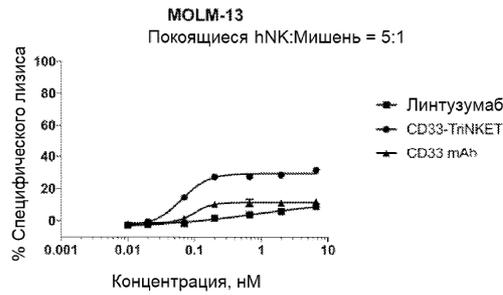
Фиг. 73В



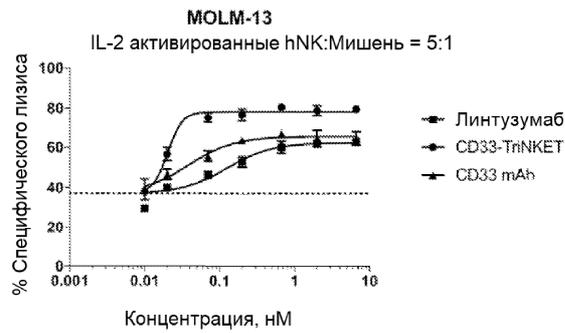
Фиг. 73С



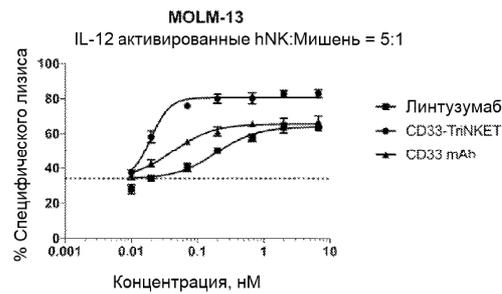
Фиг. 73D



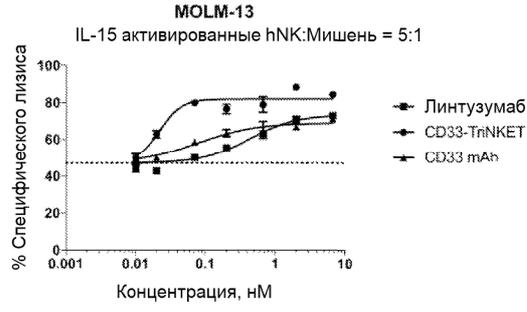
Фиг. 74А



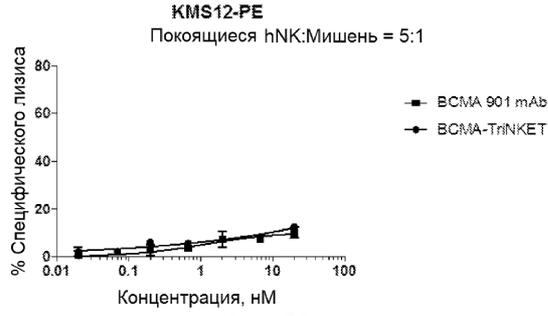
Фиг. 74В



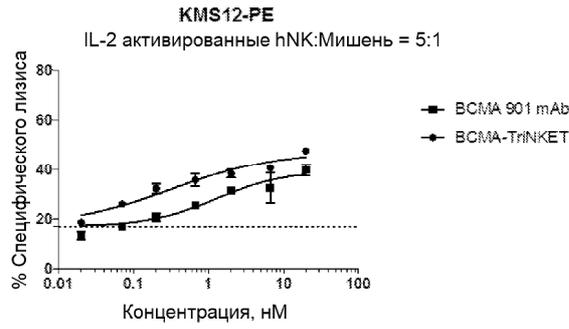
Фиг. 74С



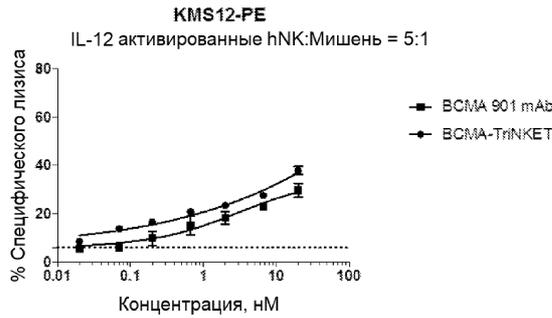
Фиг. 74D



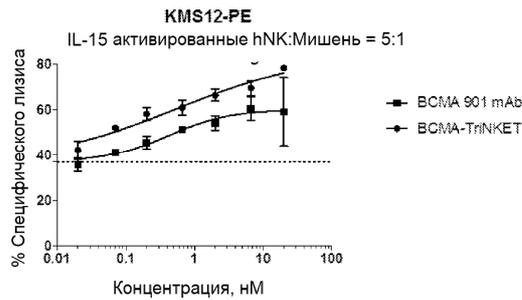
Фиг. 75A



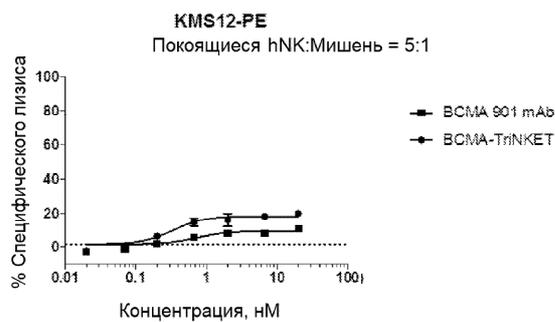
Фиг. 75B



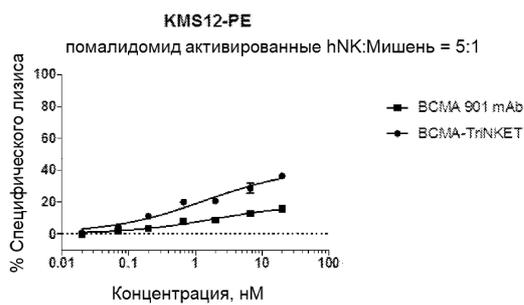
Фиг. 75C



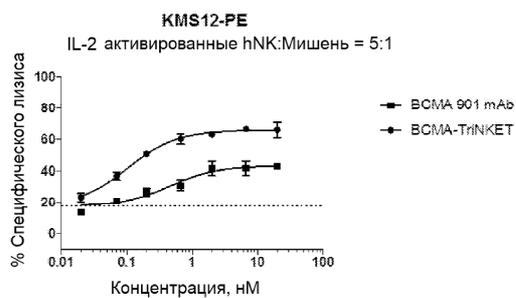
Фиг. 75D



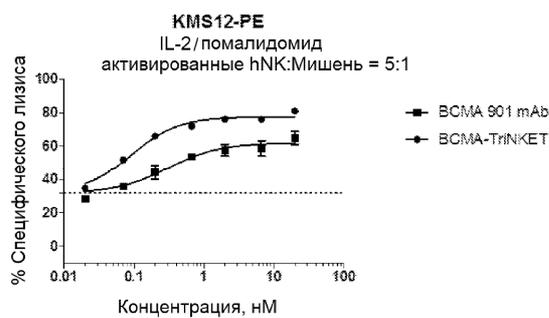
Фиг. 76А



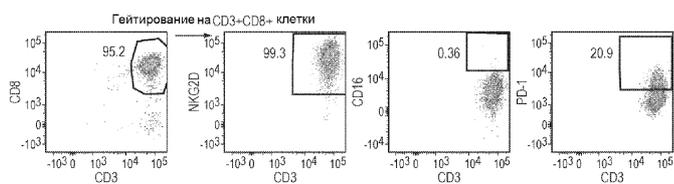
Фиг. 76В



Фиг. 76С

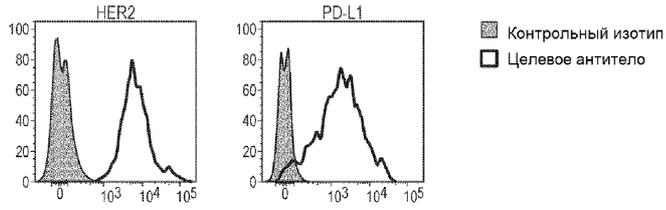


Фиг. 76D

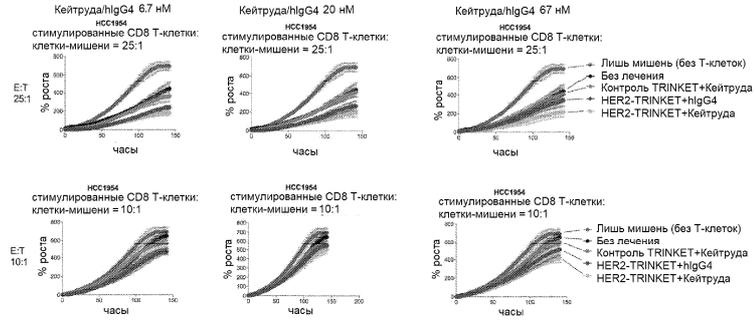


Фиг. 77А

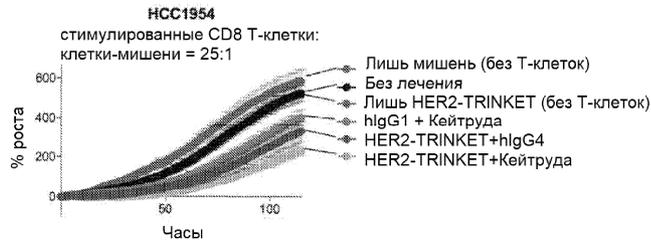
044644



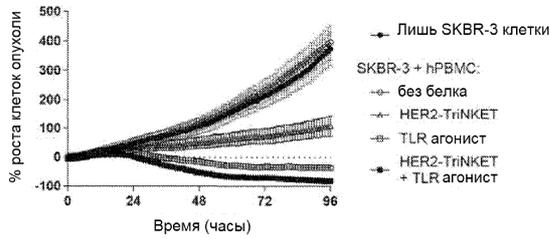
Фиг. 77В



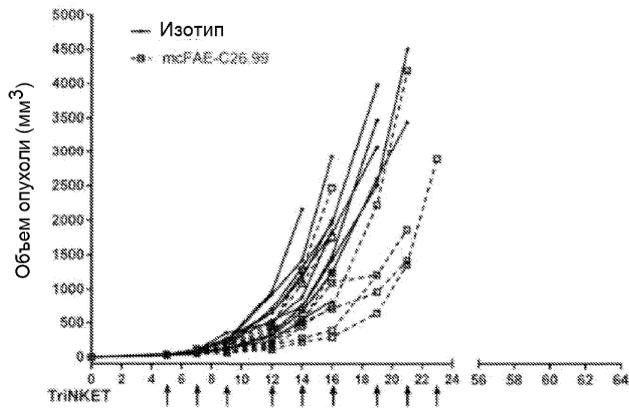
Фиг. 78А



Фиг. 78В

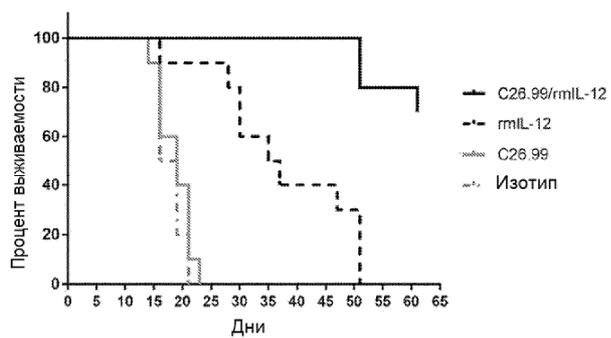


Фиг. 79



Фиг. 80А





Фиг. 81