

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046257

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.21
- (21) Номер заявки
202192998
- (22) Дата подачи заявки
2020.05.01
- (51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) CLEC12A-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

- (31) 62/843,411; 62/844,426
- (32) 2019.05.04; 2019.05.07
- (33) US
- (43) 2022.02.22
- (86) PCT/US2020/030970
- (87) WO 2020/227073 2020.11.12
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНХИБРКС, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
Раскон Лукас, Санабриа Анжелика,
Тиммер Джон К., Экельман
Брендан П. (US)
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) WO-A1-2014051433
WO-A1-2017125897
WO-A1-2020052543
WO-A1-2020113063

-
- (57) Представлены VHH-содержащие полипептиды, которые связываются с CLEC12a. Также представлено применение VHH-содержащих полипептидов.

046257
B1

046257
B1

046257
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/843411, поданной 4 мая 2019 г., и предварительной заявки США № 62/844426, поданной 7 мая 2019 г., каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки для любых целей.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к CLEC12a-связывающим полипептидам и способам применения CLEC12a-связывающих полипептидов для модуляции биологической активности CLEC12a. Такие способы включают без ограничения способы лечения рака.

Уровень техники

CLEC12a, также известный как CLL-1, CLL1, DCAL-2, MICL, CD371 или член А семейства 12 лектиновых доменов С-типа, является членом суперсемейства лектинового домена С-типа/лектинподобного домена С-типа (CTL/CTLD) и регулирует активацию миелоидных клеток. CLEC12a также является маркером бластных и лейкозных стволовых клеток у пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Кроме того, CLEC12a использовался для выявления минимальной остаточной болезни у пациентов после лечения от ОМЛ. Следовательно, существует терапевтическая потребность в более эффективных методах лечения CLEC12a-экспрессирующего рака.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены CLEC12a-связывающие полипептиды и способы применения CLEC12a-связывающих полипептидов для лечения, например, лейкоза. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH. Некоторые варианты осуществления представлены ниже.

Вариант осуществления 1. Полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, который связывается с CLEC12a и который содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, 32, 3, 7, 11, 15, 19, 23, 35, 38, 41 или 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, 33, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 39, 42 или 45; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, 34, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37, 40, 43 или 46.

Вариант осуществления 2. Полипептид по варианту осуществления 1, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 или 23; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 или 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 или 25.

Вариант осуществления 3. Полипептид по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или 4; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 5.

Вариант осуществления 4. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-3, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 35; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 36; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 37.

Вариант осуществления 5. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-4, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 38; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 40.

Вариант осуществления 6. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-5, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 42; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или 43.

Вариант осуществления 7. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-6, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 45; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 46.

Вариант осуществления 8. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-7, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34; SEQ ID NO: 47, 48 и 49; SEQ ID NO: 3, 4 и 5; SEQ ID NO: 7, 8 и 9; SEQ ID NO: 11, 12 и 13; SEQ ID NO: 15, 16 и 17; SEQ ID NO: 19, 20 и 21; SEQ ID NO: 23, 24 и 25; SEQ ID NO: 35, 36 и 37; SEQ ID NO: 38, 39 и 40; SEQ ID NO: 41, 42 и 43; SEQ ID NO: 44, 45 и 46.

Вариант осуществления 9. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-8, у которого по меньшей мере один домен VHH является гуманизированным.

Вариант осуществления 10. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-9, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, 94, 31, 99, 27, 28, 29, 30, 95, 96, 97 или 98.

Вариант осуществления 11. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-9, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 94, 31, 99, 27, 28, 29, 30, 95, 96, 97 или 98.

Вариант осуществления 12. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-8, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

Вариант осуществления 13. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-8, у которого по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

Вариант осуществления 14. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-13, содержащий два домена VHH.

Вариант осуществления 15. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-13, содержащий три домена VHH.

Вариант осуществления 16. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-15, содержащий по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с антигеном, отличным от CLEC12a.

Вариант осуществления 17. Полипептид по варианту осуществления 16, содержащий по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с CD3, Т-клеточным рецептором (TCR) α , TCR β , CD28, CD16, CD32A, CD64, CD89, NKp46 или NKG2D.

Вариант осуществления 18. Полипептид по варианту осуществления 14 или 15, у которого каждый домен VHH связывается с CLEC12a.

Вариант осуществления 19. Полипептид по варианту осуществления 18, у которого каждый домен VHH содержит одинаковые аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3.

Вариант осуществления 20. Полипептид по варианту осуществления 18, у которого каждый домен VHH содержит одну и ту же последовательность VHH.

Вариант осуществления 21. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-13, содержащий один домен VHH.

Вариант осуществления 22. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-21, содержащий Fc-участок.

Вариант осуществления 23. Полипептид по варианту осуществления 22, у которого Fc-участок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 50-85.

Вариант осуществления 24. Полипептид по варианту осуществления 22 или варианту осуществления 23, который в физиологических условиях образует димер.

Вариант осуществления 25. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-24, где CLEC12a представляет собой человеческий CLEC12a.

Вариант осуществления 26. Полипептид по варианту осуществления 25, где человеческий CLEC12a содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 27. Иммуноконъюгат, содержащий полипептид по любому из вариантов осуществления 1-26 и цитотоксический агент.

Вариант осуществления 28. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 27, где цитотоксический агент выбирают из калихеамицина, ауристатиона, доластатиона, тубулицина, майтанзиноида, криптофицина, дуокармицина, эсперамицина, пирролобензодиазепина и эндиинового антибиотика.

Вариант осуществления 29. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-26 или иммуноконъюгат по варианту осуществления 27 или варианту осуществления 28 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-26.

Вариант осуществления 31. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 30.

Вариант осуществления 32. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 34 или вектор по варианту осуществления 31.

Вариант осуществления 33. Клетка-хозяин, которая экспрессирует полипептид по любому из вариантов осуществления 1-26.

Вариант осуществления 34. Способ получения полипептида по любому из вариантов осуществления 1-26, включающий инкубацию клетки-хозяина по варианту осуществления 32 или варианту осуществления 33 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида.

Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 37, дополнительно включающий выделение полипептида.

Вариант осуществления 36. Способ лечения рака, включающий введение страдающему раком субъекту фармацевтически эффективного количества полипептида по любому из вариантов осуществления 1-26, иммуноконъюгата по варианту осуществления 27 или варианту осуществления 28 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 29.

Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 36, где рак выбирают из лимфомы; лимфомы Ходжкина; неходжкинской лимфомы; В-клеточной лимфомы; низкой степени злокачественности/фоликулярной неходжкинской лимфомы (НХЛ); НХЛ из малых лимфоцитов (МЛ); средней степени злокачественности/фоликулярной НХЛ; диффузной НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластной НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластной НХЛ высокой степени злокачественности; НХЛ из мелких нерасщепленных клеток с высокой степенью злокачественности; объемной НХЛ; лимфомы из клеток мантийной зоны; лимфомы, связанной со СПИДом; макроглобулинемии Вальденстрема; хронического лимфолейкоза (ХЛЛ); острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); острого миелоидного лейкоза (ОМЛ); волосатоклеточного лейкоза; и хронического миелобластного лейкоза.

Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 36 или 37, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Вариант осуществления 39. Способ по любому из вариантов осуществления 36-38, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического агента.

Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 39, где дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковое средство.

Вариант осуществления 41. Способ по варианту осуществления 40, где противораковое средство выбирают из химиотерапевтического средства, биологического противоракового средства, лучевой терапии, CAR-T терапии и онколитического вируса.

Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 36-39, где рак представляет собой CLEC12a-экспрессирующий рак.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A и 1B показаны данные биослойной интерферометрии для полипептидов, содержащих домен VHH, который связывается с CLEC12a. На фиг. 1A показаны данные биослойной интерферометрии для hzMB11v13 по сравнению с другими CLEC12a-связывающими sdAb, раскрытыми в настоящем изобретении. На фиг. 1B показаны данные биослойной интерферометрии для hzME06v16 по сравнению с другими CLEC12a-связывающими sdAb, раскрытыми в настоящем изобретении.

На фиг. 2A-2L показано связывание определенных однодоменных антител (sdAb) с CLEC12a, экспрессируемым на клетках НЕК 293. "CLEC12a-НЕК-293" обозначает клетки НЕК 293, которые были трансфицированы плазмидой, кодирующей CLEC12a, как описано в примере 2. "НЕК-293" обозначает нетрансфицированные клетки НЕК 293. На фиг. 2A показано связывание MB11-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2B показано связывание hzMB11v13-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2C показано связывание ME06-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2D показано связывание hzME06v16-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2E показано связывание MC02-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2F показано связывание hzMC02v6-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2G показано связывание MH07-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2H показано связывание hzMh07v3-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2I показано связывание MC06-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2J показано связывание hzMC06v2-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2K показано связывание ME02-IgG1 с CLEC12a. На фиг. 2L показано связывание hzME02v4-IgG1 с CLEC12a.

Подробное описание

Представленные в настоящем изобретении варианты осуществления относятся к CLEC12a-связывающим полипептидам и их применению в различных способах лечения рака.

Определения и различные варианты осуществления.

Заголовки разделов, используемые в настоящем изобретении, предназначены исключительно для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описанный объект изобретения.

Все ссылки, цитируемые в настоящем изобретении, включая заявки на патенты, патентные публикации и номера доступа Genbank, включены в настоящее описание в качестве ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и отдельно указана как включенная в качестве ссылки во всей своей полноте.

Способы и процедуры, раскрытые или упомянутые в настоящем изобретении, в целом являются хорошо известными и традиционными методами, обычно применяемыми специалистами в данной области техники, такими как, например, широко используемые методы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel et al., eds. (2003)); серия METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor, eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988), ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998), Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998), Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8), J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in

Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993); и их обновленных версиях.

Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в контексте настоящего изобретения, имеют значения, обычно используемые специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не следует из контекста или не указано в явном виде, термины в единственном числе подразумевают включение множественного числа, а термины во множественном числе подразумевают включение единственного числа. При любом противоречии в определениях между различными источниками или ссылками приоритетным является определение, приведенное в настоящем изобретении.

Как правило, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует индексу EU по Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). "Индекс EU по Kabat" относится к нумерации остатков человеческого IgG1 антитела согласно EU.

Следует учитывать, что варианты осуществления изобретения, раскрытые в настоящем изобретении, включают варианты осуществления "состоящий" и/или "по существу состоящий из". Используемые в настоящем изобретении формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если не указано иное. Использование в настоящем изобретении термина "или" не означает, что альтернативы являются взаимоисключающими.

В настоящем изобретении использование "или" означает "и/или", если иное не указано в явном виде или не является очевидным специалисту в данной области. В контексте пункта формулы изобретения с множественной зависимостью использование "или" относится к более чем одному предшествующему независимому или зависимому пункту формулы изобретения.

Фраза "эталонный образец", "эталонная клетка" или "эталонная ткань" означает образец по меньшей мере с одной известной характеристикой, который можно использовать в качестве сравнения с образцом по меньшей мере с одной неизвестной характеристикой. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец можно использовать в качестве положительного или отрицательного индикатора. Эталонный образец можно использовать для определения уровня белка и/или мРНК, наблюдаемого, например, в здоровой ткани, в отличие от уровня белка и/или мРНК в образце с неизвестными характеристиками. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получают от того же субъекта, но из другой части, отличной от тестируемой. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец берут из области ткани, окружающей или прилегающей к раку. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получают не от испытуемого, а от субъекта, о котором известно, что у него имеется или не имеется исследуемое расстройство (например, конкретный рак или расстройство, связанное с CLEC12a). В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получают от того же субъекта, но до момента возникновения рака. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец происходит из образца доброкачественного рака того же или другого субъекта. Когда для сравнения используется отрицательный контрольный образец, уровень экспрессии или количество изучаемой молекулы в отрицательном эталонном образце будет указывать на уровень, относительно которого специалист в данной области техники сможет установить, с учетом настоящего описания, что молекула отсутствует и/или находится на низком уровне. Когда для сравнения используется положительный эталонный образец, уровень экспрессии или количество изучаемой молекулы в положительном эталонном образце будет указывать на уровень, относительно которого специалист в данной области сможет установить, с учетом настоящего описания, что молекула присутствует на некотором уровне.

Термины "польза", "клиническая польза", "восприимчивость" и "терапевтическая восприимчивость", используемые в настоящем изобретении в контексте положительного воздействия или реакции на введение терапевтического агента, могут быть измерены путем оценки различных конечных точек, например, ингибирования до некоторой степени прогрессирования заболевания, включая замедление и полную остановку; уменьшения количества эпизодов и/или симптомов заболевания; уменьшения размеров поражения; ингибирования (т.е. уменьшения, замедления или полного прекращения) инфильтрации болезнетворных клеток в соседние периферические органы и/или ткани; торможения (т.е. уменьшения, замедления или полного прекращения) распространения заболевания; облегчения до некоторой степени одного или более симптомов, связанных с расстройством; увеличения продолжительности безрецидивного течения после лечения, например выживаемости без прогрессирования заболевания; повышенной общей выживаемости; более высокой скорости ответа; и/или снижения смертности в определенный момент времени после лечения. Субъект или рак, который "не отвечает" или "не реагирует", является субъектом или раком, не отвечающим указанным выше требованиям к "восприимчивости".

Термины "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к полимеру нуклеотидов. Такие полимеры нуклеотидов могут

содержать природные и/или неприродные нуклеотиды и включают без ограничения ДНК, РНК и ПНК. "Последовательность нуклеиновой кислоты" относится к линейной последовательности нуклеотидов, содержащейся в молекуле нуклеиновой кислоты или полинуклеотиде.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков, и не ограничиваются минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные аминокислотные остатки и включают без ограничения пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры аминокислотных остатков. Это определение охватывает как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Указанные термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например гликозилирование, сиапирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего раскрытия "полипептид" относится к белку, который включает модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по природе) в нативной последовательности при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например результатом сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например результатом мутаций хозяев, продуцирующих белки, или ошибок в процессе ПЦР амплификации.

"CLEC12a" в контексте настоящего описания относится к любому нативному зрелому CLEC12a, который является результатом процессинга предшественника CLEC12a в клетке. Этот термин включает CLEC12a из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди и яванские макаки или макаки резус) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Указанный термин также включает встречающиеся в природе варианты CLEC12a, такие как варианты сплайсинга или аллельные варианты. Неограничивающая иллюстративная аминокислотная последовательность человеческого CLEC12a показана, например, в UniProt под номером доступа Q5QGZ9.3. См. SEQ ID NO. 1.

Термин "специфически связывается" с антигеном или эпитопом является термином, который хорошо известен в данной области, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области. Говорят, что молекула проявляет "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, дольше находится в связанном состоянии и/или связывается с более высокой аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем с альтернативными клетками или веществами. Однодоменное антитело (sdAb) или VHH-содержащий полипептид "специфически связывается" или "предпочтительно связывается" с мишенью, если оно связывается с более высокой аффинностью, авидностью, легче и/или дольше находится в связанном состоянии, чем с другими веществами. Например, sdAb или VHH-содержащий полипептид, который специфически или предпочтительно связывается с эпитопом CLEC12a, представляет собой sdAb или VHH-содержащий полипептид, который связывается с этим эпитопом с более высокой аффинностью, авидностью, легче и/или дольше находится в связанном состоянии, чем с другими эпитопами CLEC12a или не-CLEC12a эпитопами. Также, читая это определение, можно понять, что, например, sdAb или VHH-содержащий полипептид, которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. По существу "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя и может включать) исключительного связывания. Обычно, но не обязательно, ссылка на связывание означает предпочтительное связывание. "Специфичность" относится к способности связывающего белка избирательно связывать антиген.

Термины "ингибирование" или "ингибировать" относятся к уменьшению или устранению какого-либо фенотипического признака или к уменьшению или устранению частоты возникновения, степени или вероятности этого признака. "Уменьшать" или "ингибировать" означает снижать, уменьшать или подавлять активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. В некоторых вариантах осуществления "уменьшение" или "ингибирование" означает способность вызывать общее снижение на 10% или более. В некоторых вариантах осуществления "уменьшение" или "ингибирование" означает способность вызывать общее снижение на 50% или более. В некоторых вариантах осуществления "уменьшение" или "ингибирование" означает способность вызывать общее снижение на 75, 85, 90, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления указанное выше количество подавляется или уменьшается в течение некоторого периода времени по сравнению с контролем за тот же период времени. В контексте настоящего описания термин "ингибировать" в отношении активности CLEC12a относится к снижению активности CLEC12a, такой как связывание с однозамещенным уратом натрия. В некоторых вариантах осуществления "ингибировать" относится к снижению активности CLEC12a по сравнению с активностью CLEC12a в отсутствие модулятора. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид ингибирует связывание CLEC12a с однозамещенным уратом натрия кислотой.

В контексте настоящего описания термин "эпитоп" относится к участку на целевой молекуле (например, антигене, таком как белок, нуклеиновая кислота, углевод или липид), с которой связывается антигенсвязывающая молекула (например, sdAb или VHH-содержащий полипептид). Эпитопы часто включают химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, полипептиды или боковые цепи сахаров, и имеют определенные характеристики трехмерной структуры, а также специфич-

ческие характеристики заряда. Эпитопы могут быть образованы как из смежных, так и/или расположенных рядом остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидного фрагмента) целевой молекулы. Эпитопы, образованные из смежных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидной части), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может включать без ограничения по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или 8-10 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления эпитоп имеет в длину менее 20 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов), менее 15 остатков или менее 12 остатков. Два антитела могут связываться с одним и тем же эпитопом внутри антигена, если они демонстрируют конкурентное связывание с антигеном. В некоторых вариантах осуществления эпитоп можно идентифицировать по определенному минимальному расстоянию до остатка CDR на антигенсвязывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может быть идентифицирован по указанному выше расстоянию и дополнительно ограничен теми остатками, которые участвуют в связи (например, водородной связи) между остатком антигенсвязывающей молекулы и остатком антигена. Эпитоп также можно идентифицировать с помощью различного типа сканирований, например сканирование аланина или аргинина может указать на один или более остатков, с которыми может взаимодействовать антигенсвязывающая молекула. Если в явном виде не указано иное, набор остатков в качестве эпитопа не исключает другие остатки из части эпитопа для конкретной антигенсвязывающей молекулы. Скорее, наличие такого набора означает наличие минимальной серии (или набора видов) эпитопов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления набор остатков, идентифицированных как эпитоп, означает минимальный эпитоп, релевантный для антигена, а не исчерпывающий список остатков эпитопа на антигене.

"Нелинейный эпитоп" или "конформационный эпитоп" включает несмежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в антигенном белке, с которым связывается антигенсвязывающая молекула, специфичная к эпитопу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков не будет смежным с другими указанными остатками эпитопа; однако один или более остатков также могут быть смежными с другими остатками.

"Линейный эпитоп" содержит смежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в антигенном белке, с которым связывается антигенсвязывающая молекула, специфичная к эпитопу. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления не требуется, чтобы каждый из остатков в линейном эпитопе был непосредственно связан (или участвовал в образовании связи) с антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления линейные эпитопы могут быть из иммунизаций пептидом, фактически состоящим из последовательности линейного эпитопа, или из структурных участков белка, которые относительно отделены от остальной части белка (так, что антигенсвязывающая молекула может взаимодействовать по меньшей мере в основном только с этим участком последовательности).

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и охватывает различные полипептиды, которые содержат антителоподобные антигенсвязывающие домены, включая без ограничения традиционные антитела (обычно содержащие по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь), однодоменные антитела (sdAb, содержащие по меньшей мере один домен VHH и Fc-участок), VHH-содержащие полипептиды (полипептиды, содержащие по меньшей мере один домен VHH) и фрагменты любого из вышеперечисленного при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен димеризации. Такие домены димеризации включают без ограничения константные домены тяжелой цепи (включая CH1, шарнир, CH2 и CH3, где CH1 обычно спарен с константным доменом легкой цепи, CL, в то время как шарнир опосредует димеризацию) и Fc-участки (включающие шарнир, CH2 и CH3, где шарнир опосредует димеризацию).

Термин "антитело" также включает без ограничения химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела различных видов, таких как верблюда (включая ламу), акулы, мыши, человека, яванского макака и т.д.

В контексте настоящего описания термин "антигенсвязывающий домен" относится к части антитела, достаточной для связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен обычного антитела содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, и любые части FR1 и/или FR4, необходимые для сохранения связывания с антигеном, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 и любые части FR1 и/или FR4, необходимые для сохранения связывания с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен sdAb или VHH-содержащего полипептида содержит три CDR домена VHH. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен sdAb или VHH-содержащего полипептида содержит домен VHH, содержащий CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, и любые части FR1 и/или FR4, необходимые для сохранения связывания с антигеном.

Термин "VHH", или "домен VHH", или "антигенсвязывающий домен VHH" в контексте настоящего

описания относится к антигенсвязывающей части однодоменного антитела, такого как антитело верблюда или антитело акулы. В некоторых вариантах осуществления VHH содержит три CDR и четыре каркасных участка, обозначенных FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В некоторых вариантах осуществления VHH может быть укороченным на N-конце или C-конце таким образом, что он содержит только часть FR1 и/или FR4, или может не содержать одну или обе указанные каркасные области при условии, что VHH по существу сохраняет связывание антигена и специфичность к нему.

Термины "однодоменное антитело" и "sdAb" в контексте настоящего описания используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего по меньшей мере один мономерный домен, такой как домен VHH, без легкой цепи, и Fc-участок. В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой димер из двух полипептидов, где каждый полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH и Fc-участок. Используемые в настоящем изобретении термины "однодоменное антитело" и "sdAb" охватывают полипептиды, которые содержат несколько доменов VHH, такие как полипептид, имеющий структуру VHH1-VHH2-Fc или VHH1-VHH2-VHH3-Fc, где VHH1, VHH2 и VHH3 могут быть одинаковыми или разными.

Термин "VHH-содержащий полипептид" относится к полипептиду, который содержит по меньшей мере один домен VHH. В некоторых вариантах осуществления полипептид VHH содержит два, три или четыре, или более доменов VHH, где каждый домен VHH может быть одним и тем же, или домены VHH могут различаться. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащий полипептид содержит Fc-участок. В некоторых таких вариантах осуществления VHH-содержащий полипептид может называться sdAb. Кроме того, в некоторых таких вариантах осуществления полипептид VHH может образовывать димер. Неограничивающие структуры VHH-содержащих полипептидов, которые также являются sdAb, включают VHH₁-Fc, VHH₁-VHH₂-Fc и VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc, где VHH₁, VHH₂ и VHH₃ могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления таких структур один VHH может быть связан с другим VHH через линкер, или один VHH может быть связан с Fc через линкер. В некоторых таких вариантах осуществления линкер содержит 1-20 аминокислот, предпочтительно 1-20 аминокислот, преимущественно состоящих из глицина и, необязательно, серина. В некоторых вариантах осуществления, когда VHH-содержащий полипептид содержит Fc, он образует димер. Таким образом, структура VHH₁-VHH₂-Fc, в случае образования димера, считается четырехвалентной (т.е. димер имеет четыре домена VHH). Аналогично, структура VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc, в случае образования димера, считается шестивалентной (т.е. димер имеет шесть доменов VHH).

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу (включая sdAb или VHH-содержащий полипептид) по существу гомогенной популяции антител, т.е. отдельные антитела, составляющие такую популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного участка. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, образец моноклональных антител может связываться с одним и тем же эпитопом на антигене. Модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела могут быть получены методом гибридомной технологии, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, описанными в патенте США № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, полученных методами, описанными, например, в McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554.

Термин "CDR" означает определяющую комплементарность область, определенную специалистом в данной области по меньшей мере одним способом идентификации. В некоторых вариантах осуществления CDR могут быть определены в соответствии с любой из схем нумерации по Чотиа (Chothia), по Кабат (Kabat), комбинации по Кабат и Чотиа, определением AbM и/или определением контакта. VHH содержит три CDR, обозначенные CDR1, CDR2 и CDR3.

В контексте настоящего описания термин "константная область тяжелой цепи" относится к области, содержащей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи, C_H1, шарнир, C_H2 и C_H3. В объем термина "константная область тяжелой цепи" безусловно входят не изменяющие функцию делеции и замены внутри доменов, если не указано иное. Неограничивающие иллюстративные константные области тяжелой цепи включают γ , δ и α . Неограничивающие иллюстративные константные области тяжелой цепи также включают ϵ и μ . Каждая тяжелая константная область соответствует изотипу антитела. Например, антитело, содержащее константную область γ , представляет собой антитело IgG, антитело, содержащее константную область δ , представляет собой антитело IgD, и антитело, содержащее константную область α , представляет собой антитело IgA. Также, антитело, содержащее константную область μ , представляет собой антитело IgM, и антитело, содержащее константную область ϵ , представляет собой антитело IgE. Некоторые изотипы могут быть дополнительно подразделены на подклассы. Например,

антитела IgG включают без ограничения антитела IgG1 (содержащие константную область γ_1), IgG2 (содержащие константную область γ_2), IgG3 (содержащие константную область γ_3) и IgG4 (содержащие константную область γ_4); антитела IgA включают без ограничения антитела IgA1 (содержащие константную область α_1) и IgA2 (содержащие константную область α_2); и антитела IgM включают без ограничения IgM1 и IgM2.

В контексте настоящего описания термин "Fc-участок" относится к части константной области тяжелой цепи, содержащей CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок содержит шарнир, CH2 и CH3. В различных вариантах осуществления, когда Fc-участок содержит шарнир, шарнир опосредует димеризацию между двумя Fc-содержащими полипептидами. Fc-участок может иметь любой изотип константной области тяжелой цепи антитела, обсуждаемый в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

"Акцепторная человеческая каркасная область" в контексте настоящего описания представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, как обсуждается в настоящем изобретении. Акцепторная человеческая каркасная область, полученная из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать замены аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных замен составляет менее 10 или менее 9, или менее 8, или менее 7, или менее 6, или менее 5, или менее 4, или менее 3 во всех человеческих каркасных областях в одном антигенсвязывающем домене, таком как VHH.

"Аффинность" относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между одним связывающим участком молекулы (например, антителом, таким как sdAb, или VHH-содержащим полипептидом) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Аффинность или кажущаяся аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d) или $K_{d\text{-apparent}}$, соответственно. Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области (такими как, например, K_d ELISA, KinExA, проточная цитометрия и/или с помощью устройства поверхностного плазмонного резонанса), включая представленные в настоящем изобретении. Такие методы включают без ограничения, помимо прочего, BIAcore®, Octet® или проточную цитометрию.

Термин " K_d " в контексте настоящего описания относится к константе равновесной диссоциации взаимодействия антигенсвязывающей молекулы/антигена. Термин " K_d ", используемый в настоящем изобретении, включает K_d и $K_{d\text{-apparent}}$.

В некоторых вариантах осуществления K_d антигенсвязывающей молекулы измеряют методом проточной цитометрии с использованием линии антиген-экспрессирующих клеток и путем подгонки средней флуоресценции, измеренной при каждой концентрации антитела, к нелинейному уравнению связывания с одним участком (Prism Software графическая панель). В некоторых таких вариантах осуществления K_d представляет собой $K_{d\text{-apparent}}$.

Термин "биологическая активность" относится к любому одному или более биологическим свойствам молекулы (присутствующей в природе, обнаруженной *in vivo*, либо представленной, либо полученной с помощью рекомбинантных средств).

"Агонист" или "активирующее" антитело представляет собой антитело, которое увеличивает и/или активирует биологическую активность целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело связывается с антигеном и увеличивает его биологическую активность по меньшей мере примерно на 20, 40, 60, 80, 85% или более.

"Антагонист", "блокирующее" или "нейтрализующее" антитело представляет собой антитело, которое ингибирует, уменьшает и/или инактивирует биологическую активность целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело связывается с антигеном и снижает его биологическую активность по меньшей мере на примерно 20, 40, 60, 80, 85, 90, 95, 99% или более.

sdAb или VHH-содержащий полипептид с "созревшей аффинностью" относится к sdAb или VHH-содержащему полипептиду с одним или более изменениями в одной или более CDR по сравнению с исходным sdAb или VHH-содержащим полипептидом, который не имеет таких изменений, при этом такие изменения приводят к улучшению аффинности sdAb или VHH-содержащего полипептида к антигену.

В контексте настоящего описания термин "гуманизированный VHH" относится к VHH, в котором одна или более каркасных областей по существу заменены человеческими каркасными областями. В некоторых случаях определенные остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированный VHH может содержать остатки, не встречающиеся ни в исходном VHH, ни в человеческих каркасных последовательностях, но которые включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик VHH-содержащего полипептида sdAb. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное sdAb или VHH-содержащий полипептид содержит человеческий Fc-участок. Понятно, что гуманизованная последовательность может быть идентифицирована по первичной последовательности и не обязательно

означает процесс, посредством которого было создано само антитело.

"Эффектор-положительный Fc-участок" обладает "эффекторной функцией" Fc-участка с нативной последовательностью. Примеры "эффекторных функций" включают связывание Fc-рецептора; связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; ингибирование рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активацию В-клеток и т.д. Для таких эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-участок был объединен со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела), причем эти функции могут быть оценены с помощью различных анализов.

"Fc-участок с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности встречающегося в природе Fc-участка. Человеческие Fc-участок с нативной последовательностью включают Fc-участок человеческого IgG1 с нативной последовательностью (не-A- и A-аллотипы); Fc-участок человеческого IgG2 с нативной последовательностью; Fc-участок человеческого IgG3 с нативной последовательностью; и Fc-участок человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их варианты, встречающиеся в природе.

"Вариант Fc-участка" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-участка с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной аминокислотной модификации. В некоторых вариантах осуществления "вариант Fc-участка" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-участка с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной аминокислотной модификации, но при этом сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-участка с нативной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-участка имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-участком с нативной последовательностью или с Fc-участком родительского полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно примерно от одной до примерно пяти аминокислотных замен в Fc-участке с нативной последовательностью или в Fc-участке родительского полипептида. В некоторых вариантах осуществления представленный в настоящем изобретении вариант Fc-участка может иметь по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности, по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% идентичности последовательности с Fc-участком с нативной последовательностью и/или с Fc-областью родительского полипептида.

"Fc-рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc-участком антитела. В некоторых вариантах осуществления Fc γ R представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой FcR, который связывается с IgG антителом (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), имеющие сходные аминокислотные последовательности и отличающиеся главным образом цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит в цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый мотив активации (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит в цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый мотив ингибирования (ITIM). (См., например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Обзор FcR представлен, например, в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Термин "FcR", используемый в настоящем изобретении, охватывает и другие FcR, включая FcR, которые могут быть идентифицированы в будущем. Например, термин "рецептор Fc" или "FcR" также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Известны способы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today*, 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.*, 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.).

Термин "химерный антигенный рецептор" в контексте настоящего описания относится к сконструированному полипептиду, который включает внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенраспознающий домен содержит VHH-домен.

В контексте настоящего описания термин "по существу аналогичный" или "по существу такой же" означает достаточно высокую степень сходства между двумя или более числовыми значениями настолько, что с точки зрения специалиста в данной области техники такая разница между двумя или более значениями является низкой или не имеющей биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеренной с помощью указанного значения. В некоторых вариантах осуществления два или более практически одинаковых значения различаются не более чем примерно на любое из 5, 10, 15, 20, 25 или 50%.

"Вариант" полипептида означает биологически активный полипептид, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью после выравнивания последовательностей и введения при необходимости пропусков (гэпов) для достижения максимального процента идентичности последовательностей без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Такие варианты включают, например, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены или удалены на N- или C-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь по меньшей мере примерно 80% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь по меньшей мере примерно 90% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь по меньшей мере примерно 95% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью.

В контексте настоящего описания "процент (%)" идентичности аминокислотной последовательности и "гомологию" по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела определяют в виде процента аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения при необходимости пропусков для достижения максимального процента идентичности последовательностей без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с помощью общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Аминокислотная замена может включать без ограничения замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Типичные замены показаны в табл. 1. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело, и продукты подвергнуты скринингу на наличие желаемой активности, например сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

Таблица 1

| Исходный остаток | Иллюстративные замены |
|------------------|------------------------------------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn |
| Asn (N) | Gln; His; Asp; Lys; Arg |
| Asp (D) | Glu; Asn |
| Cys (C) | Ser; Ala |
| Gln (Q) | Asn; Glu |
| Glu (E) | Asp; Gln |
| Gly (G) | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин |
| Leu (L) | норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile |

| | |
|---------|------------------------------------|
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr |
| Pro (P) | Ala |
| Ser (S) | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин |

Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на другой класс.

Термин "вектор" используется для описания полинуклеотида, который может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые могут быть размножены в клетке-хозяине. Вектор может включать один или более из следующих элементов: точку начала репликации, одну или более регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или энхансеры), которые регулируют экспрессию представляющего интерес полипептида, и/или один или более селективных маркерных генов (таких как, например, гены устойчивости к антибиотикам и гены, которые можно использовать в колориметрических анализах, например, β -галактозидазы). Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, который используется для экспрессии представляющего интерес полипептида в клетке-хозяине.

"Клетка-хозяин" относится к клетке, которая может быть или была реципиентом вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками или эукариотическими клетками. Примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, такие как клетки животных приматов или неprimатов; клетки грибов, таких как дрожжи; клетки растений; и клетки насекомых. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают без ограничения клетки NSO, клетки PER.C6® (Crucell) и клетки 293 и CHO, а также их производные, такие как клетки 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S и CHO-DS. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или комплементарной геномной ДНК) исходной родительской клетке в силу одной случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами), представленным(ыми) в настоящем изобретении.

В контексте настоящего описания термин "выделенный" относится к молекуле, которая была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она обычно встречается в природе или продуцируется. Например, полипептид называют "выделенным", когда он отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой был получен. Когда полипептид секретируется клеткой после экспрессии, то физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид, от продуцирующей его клетки считается "выделением" полипептида. Точно так же полинуклеотид называют "выделенным", если он не является частью более крупного полинуклеотида (такого как, например, геномная ДНК или митохондриальная ДНК, в случае ДНК-полинуклеотида), в котором он обычно встречается в природе, или отделен по меньшей мере от некоторых компонентов продуцирующей его клетки, например, в случае РНК-полинуклеотида. Таким образом, ДНК-полинуклеотид, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, можно назвать "выделенным".

Термины "индивидуум" и "субъект" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения животного, например млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения млекопитающих, включая, помимо прочего, людей, грызунов, обезьян, кошек, собак, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, лабораторных животных-млекопитающих, сельскохозяйственных животных-млекопитающих, спортивных животных-млекопитающих и домашних животных-млекопитающих. В некоторых примерах "индивидуум" или "субъект" относится к индивиду или субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение, может быть пациентом, что указывает на тот факт, что субъект идентифицирован как страдающий подлежащим лечению расстройством или имеющий достоверный риск развития этого расстройства.

Термин "заболевание" или "расстройство" в контексте настоящего описания относится к состоя-

нию, при котором необходимо и/или желательное лечение.

Термины "опухолевая клетка", "раковая клетка", "рак", "опухоль" и/или "новообразование", если не указано иное, используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и относятся к клетке (или клеткам) с неконтролируемым ростом и/или аномальным увеличением выживаемости клеток и/или ингибированием апоптоза, мешающим нормальному функционированию органов и систем организма. Это определение включает доброкачественные и злокачественные опухоли, гематологические виды рака, такие как лейкемии, лимфомы и множественные миеломы, полипы, гиперплазию, а также латентные опухоли или микрометастазы.

Термины "рак" и "опухоль" включают солидный и гематологический/лимфатический рак, а также включают злокачественный, предзлокачественный и доброкачественный рост, такой как дисплазия. Примеры рака включают без ограничения базальноклеточную карциному, рак желчных путей; рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и центральной нервной системы; рак молочной железы; рак брюшины; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаза; рак головы и шеи; рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта); глиобластому; карциному печени; гепатому; внутриэпителиальное новообразование; рак почки или почек; рак гортани; лейкемию; рак печени; рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого); меланому; миелому; нейробластому; рак полости рта (губ, языка, рта и глотки); рак яичников; панкреатический рак; рак простаты; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательной системы; карциному слюнной железы; саркому; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки или эндометрия; рак мочевыводящей системы; рак вульвы; лимфому, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, а также В-клеточную лимфому (включая низкой степени злокачественности/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); НХЛ из малых лимфоцитов (МЛ); средней степени злокачественности/фолликулярную НХЛ; средней степени злокачественности диффузную НХЛ; высокой степени злокачественности иммунобластную НХЛ; высокой степени злокачественности лимфобластную НХЛ; высокой степени злокачественности НХЛ из мелких нерасщепленных клеток; массивную НХЛ; лимфому из клеток мантимальной зоны; лимфому, связанную со СПИДом; и макроглобулинемию Вальденстрема; острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; а также другие карциномы и саркомы; и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (ПТЛР), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факотоматозами, отек (например, связанный с опухолями головного мозга) и синдром Мейгса.

Термин "неопухолевая клетка" или "нераковая клетка" в контексте настоящего описания относится к нормальным клеткам или ткани. Примеры неопухолевых клеток включают без ограничения Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (НК) клетки, естественные киллерные Т (НКТ)-клетки, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки, фибробласты, гепатоциты, интерстициальные клетки почек, фибробластоподобные синовиоциты, остеобласты и клетки, расположенные в молочной железе, скелетных мышцах, поджелудочной железе, желудке, яичнике, тонком кишечнике, плаценте, матке, яичках, почках, легких, сердце, мозге, печени, простате, толстой кишке, лимфоидных органах, кости, и мезенхимальные стволовые клетки костного происхождения. Используемый в настоящем изобретении термин "клетка или ткань, расположенная на периферии" относится к неопухолевым клеткам, которые не расположены рядом с опухолевыми клетками и/или в микроокружении опухоли.

В контексте настоящего описания термин "клетки или ткань в микроокружении опухоли" относится к клеткам, молекулам, внеклеточному матриксу и/или кровеносным сосудам, которые окружают и/или питают опухолевую клетку. Примеры клеток или ткани в микроокружении опухоли включают без ограничения сосудистую сеть опухоли; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; фибробластные ретикулярные клетки; эндотелиальные клетки-предшественники (ЕРС); ассоциированные с раком фибробласты; перициты; другие стромальные клетки; компоненты внеклеточного матрикса (ЕСМ); дендритные клетки; антигенпрезентирующие клетки; Т-клетки; регуляторные Т-клетки (Трег-клетки); макрофаги; нейтрофилы; супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и другие иммунные клетки, расположенные проксимальнее опухоли. Способы идентификации опухолевых клеток и/или клеток/тканей, расположенных в микроокружении опухоли, хорошо известны в данной области, как раскрыто в настоящем изобретении ниже.

В некоторых вариантах осуществления "увеличение" или "уменьшение" относится к статистически значимому увеличению или уменьшению, соответственно. Как будет ясно специалисту в данной области техники, "модуляция" также может включать изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) аффинности, авидности, специфичности и/или селективности мишени или антигена к одному или более из его лигандов, партнеров по связыванию, партнеров по ассоциации в гомомультимерную или гетеромультимерную форму или субстратов; изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) чувствительности мишени или антигена к одному или более условиям среды или окружения, в которых присутствует мишень или антиген (например, рН, сила ионов, присутствие сопут-

ствующих факторов и др.); и/или клеточную пролиферацию или продуцирование цитокинов по сравнению с теми же условиями, но в отсутствие тестируемого агента. Это может быть определено любым подходящим способом и/или с помощью любого подходящего известного или раскрытого в настоящем изобретении анализа в зависимости от задействованной мишени.

В контексте настоящего описания термин "иммунный ответ" означает клеточные и/или гуморальные иммунные ответы, которые достаточны для подавления или предотвращения появления или облегчения симптомов заболевания (например, рака или метастазов рака). "Иммунный ответ" может охватывать аспекты как врожденной, так и адаптивной иммунной системы.

В контексте настоящего описания термин "лечение" представляет собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. В контексте настоящего описания термин "лечение" охватывает любое введение или применение терапевтического средства для лечения заболевания у млекопитающего, включая человека. Для целей настоящего раскрытия полезные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, любое одно или более из следующего: облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, предотвращение или задержку распространения (например, метастазов, например метастаза в легкое или лимфатический узел) заболевания, предотвращение или отсрочку рецидива заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение болезненного состояния, подавление заболевания или его прогрессирования, подавление или замедление заболевания или его прогрессирования, купирование его развития и ремиссию (частичную или полную). Термин "лечение" также включает уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания. Представленные в настоящем изобретении способы предполагают любой один или более из этих аспектов лечения. В соответствии с вышеизложенным, термин "лечение" не требует полного устранения всех аспектов расстройства.

"Облегчение" означает уменьшение или улучшение одного или более симптомов по сравнению с отсутствием введения терапевтического агента. "Облегчение" также включает сокращение или уменьшение продолжительности симптома.

Термин "противораковое средство" используется в настоящем изобретении в самом широком смысле для обозначения агентов, которые используются для лечения одного или более видов рака. Примеры классов таких агентов включают без ограничения химиотерапевтические средства, противораковые биологические средства (такие как цитокины, слитые белки Fc-внеклеточный доменный рецептор и антитела), лучевую терапию, CAR-T клеточную терапию, терапевтические олигонуклеотиды (такие как антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК) и онколитические вирусы.

Термин "биологический образец" означает количество вещества, полученного от живого существа или ранее живого существа. Такие вещества включают, помимо прочего, кровь (например, цельную кровь), плазму, сыворотку, мочу, амниотическую жидкость, синовиальную жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфатические узлы и селезенку.

Термин "контроль" или "эталон" в контексте эксперимента или сравнения относится к композиции, о которой известно, что она не содержит аналит ("отрицательный контроль") или содержит аналит ("положительный контроль"). Положительный контроль может включать известную концентрацию аналита. Контроль или эталон также может относиться к контрольному агенту, о котором известно, что у него отсутствует активность тестируемого агента, такого как антитело.

В контексте настоящего описания термин "задержка развития заболевания" означает отсрочку, сдерживание, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или отдаление развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или человека, которому предоставляется лечение. Как очевидно для специалиста в данной области, достаточная или значительная задержка может фактически включать профилактику в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, может быть отсрочена поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов.

"Предотвращение" в контексте настоящего описания включает обеспечение профилактики возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может иметь предрасположенность к заболеванию, но у которого оно еще не диагностировано. Если не указано иное, термины "уменьшать", "ингибировать" или "предотвращать" не означают и не требуют полного предотвращения в течение всего времени, но только в период времени, когда происходит измерение.

"Терапевтически эффективное количество" вещества/молекулы, агониста или антагониста может меняться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность вещества/молекулы, агониста или антагониста вызывать желаемый ответ у человека. Терапевтически эффективное количество также является количеством, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсические или вредные эффекты вещества/молекулы, агониста или антагониста. Терапевтически эффективное количество может быть доставлено за одно или несколько введений. Терапевтически эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического и/или профилактического результата.

Термины "фармацевтический состав" и "фармацевтическая композиция" используются взаимозаменяемо и относятся к препарату, который находится в форме, обеспечивающей эффективность биологической активности активного(ых) ингредиента(ов) и который не содержит дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будет вводиться этот состав. Такие составы могут быть стерильными.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу, вспомогательному веществу или носителю, обычно используемому в данной области с терапевтическим агентом, которые вместе составляют "фармацевтическую композицию", предназначенную для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель подходит для используемого состава.

Введение "в комбинации с" одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин "параллельно" используется в настоящем изобретении для обозначения введения двух или более терапевтических агентов, когда введения по меньшей мере частично перекрываются по времени, или когда введение одного терапевтического агента попадает в короткий промежуток времени во время введения другого терапевтического агента, или когда терапевтические эффекты обоих агентов перекрываются по меньшей мере в течение некоторого периода времени.

Термин "последовательно" используется в настоящем изобретении для обозначения введения двух или более терапевтических агентов, которые не перекрываются по времени или при котором терапевтические эффекты агентов не перекрываются.

В контексте настоящего описания термин "в комбинации с" относится к введению одного терапевтического средства в дополнение к другому терапевтическому средству. Таким образом, "в комбинации с" относится к введению одного терапевтического средства до, во время или после введения индивидууму другого терапевтического средства.

Термин "вкладыш в упаковку" используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, способах введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения таких лечебных продуктов.

"Изделие" представляет собой любой продукт (например, упаковку или контейнер) или набор, содержащий по меньшей мере один реагент, например, лекарственное средство для лечения заболевания или расстройства (например, рака), или зонд для специфического обнаружения биомаркера, раскрытого в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления продукт или набор рекламируется, распространяется или продается как единое целое для осуществления представленных в настоящем изобретении способов.

Термины "метка" и "детектируемая метка" означают фрагмент, присоединенный, например, к антигену или антигену для обеспечения детектируемой реакции (например, связывания) между членами пары специфического связывания. Меченый член пары специфического связывания называется "меченым для обнаружения". Таким образом, термин "меченый связывающий белок" относится к белку с включенной меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой детектируемый маркер, который может производить сигнал, детектируемый визуальными или инструментальными средствами, например, путем включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены меченым авидином (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). Примеры меток для полипептидов включают без ограничения следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho или ^{153}Sm); хромофены, флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры лантаноидов), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, люциферазу, щелочную фосфатазу); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки); и магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммуноанализов, включают фрагменты, излучающие свет, например соединения акридиния, и фрагменты, излучающие флуоресценцию, например флуоресцеин. В этом случае сам фрагмент может быть не меченым детектируемой меткой, но может стать детектируемым после реакции с еще одним фрагментом.

Иллюстративные CLEC12a-связывающие полипептиды.

В настоящем изобретении представлены CLEC12a-связывающие полипептиды. В различных вариантах осуществления CLEC12a-связывающие полипептиды содержат по меньшей мере один домен VHH, который связывается с CLEC12a. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a представляет собой человеческий CLEC12a. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид

блокирует связывание CLEC12a с лигандом. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении, содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь доменов VHH, которые связываются с CLEC12a. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении, содержит один, два, три или четыре домена VHH, которые связываются с CLEC12a. CLEC12a-связывающие полипептиды могут содержать один или более доменов VHH, которые связываются с одним или более целевыми белками, отличными от CLEC12a. Такие полипептиды можно назвать "полиспецифическими" полипептидами.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH, который связывается с CLEC12a, и Fc-участок. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении, содержит один, два, три или четыре домена VHH и Fc-участок. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок опосредует димеризацию CLEC12a-связывающего полипептида в физиологических условиях с образованием димера, который удваивает количество участков связывания CLEC12a. Например, CLEC12a-связывающий полипептид, содержащий три домена VHH, которые связываются с CLEC12a, и Fc-участок, является трехвалентным в качестве мономера, но в физиологических условиях Fc-участок может опосредовать димеризацию, в результате которой CLEC12a-связывающий полипептид будет существовать в таких условиях в виде шестивалентного димера.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере два домена VHH, где первый домен VHH связывается с первым эпитопом CLEC12a, а второй домен VHH связывается со вторым эпитопом CLEC12a. Когда CLEC12a-связывающий полипептид содержит домен VHH, который связывается с первым эпитопом CLEC12a, и домен VHH, который связывается со вторым эпитопом CLEC12a, CLEC12a-связывающий полипептид может называться "биэпитопическим" или "биспецифическим". В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере два домена VHH, где первый домен VHH связывается с CLEC12a, а второй домен VHH связывается с антигеном, отличным от CLEC12a. Такие полипептиды могут называться "биспецифическими" или "полиспецифическими".

Неограничивающие иллюстративные CLEC12a-связывающие полипептиды приведены в табл. 2. Последовательности указанных однодоменных антител показаны в таблице для некоторых последовательностей, представленных в настоящем изобретении. Название полипептида, начинающееся с "hz", указывает на то, что это гуманизованная версия соответствующего родительского полипептида.

Таблица 2

Полипептиды, содержащие по меньшей мере один VHH, который связывается с CLEC12a

| Название | CDR | VHH (или K вариант или KP вариант) |
|---------------|------------------------|------------------------------------|
| MB11 | SEQ ID NO: 3, 4 и 5 | SEQ ID NO: 2 (или SEQ ID NO: 88) |
| MC02 | SEQ ID NO: 7, 8 и 9 | SEQ ID NO: 6 (или SEQ ID NO: 89) |
| MC06 | SEQ ID NO: 11, 12 и 13 | SEQ ID NO: 10 (или SEQ ID NO: 90) |
| ME02 | SEQ ID NO: 15, 16 и 17 | SEQ ID NO: 14 (или SEQ ID NO: 91) |
| ME06 | SEQ ID NO: 19, 20 и 21 | SEQ ID NO: 18 (или SEQ ID NO: 92) |
| MH07 | SEQ ID NO: 23, 24 и 25 | SEQ ID NO: 22 (или SEQ ID NO: 93) |
| hzMB11v1 3 | SEQ ID NO: 32, 33 и 34 | SEQ ID NO: 26 (или SEQ ID NO: 94) |
| hzMC02v6 | SEQ ID NO: 35, 36 и 37 | SEQ ID NO: 27 (или SEQ ID NO: 95) |
| hzMC06v2 | SEQ ID NO: 38, 39 и 40 | SEQ ID NO: 28 (или SEQ ID NO: 96) |
| hzME02v4 | SEQ ID NO: 41, 42 и 43 | SEQ ID NO: 29 (или SEQ ID NO: 97) |
| hzME06v16 | SEQ ID NO: 44, 45 и 46 | SEQ ID NO: 30 (или SEQ ID NO: 98) |
| haMH07v3 | SEQ ID NO: 47, 48 и 49 | SEQ ID NO: 31 (или SEQ ID NO: 99) |

CLEC12a-связывающие полипептиды.

В различных вариантах осуществления домен VHH, который связывается с CLEC12a, содержит последовательность CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 32, 35, 38, 41, 44 и 47; последовательность CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 33, 36, 39, 42, 45 и 48; и последовательность CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 5, 9, 13, 17, 21, 25, 34, 37, 40, 43, 46 и 49. В различных вариантах осуществления домен VHH, который связывается с CLEC12a, содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, выбранные из: SEQ ID NO: 3, 4, и 5; SEQ ID NO: 7, 8 и 9; SEQ ID NO: 11, 12 и 13; SEQ ID NO: 15, 16 и 17; SEQ ID NO: 19, 20 и 21; SEQ ID NO: 23, 24 и 25; SEQ ID NO: 32, 33 и 34;

SEQ ID NO: 35, 36 и 37; SEQ ID NO: 38, 39 и 40; SEQ ID NO: 41, 42 и 43; SEQ ID NO: 44, 45 и 46; и SEQ ID NO: 47, 48 и 49. В различных вариантах осуществления домен VHH является гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления домен VHH, который связывается с CLEC12a, содержит аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99. В некоторых вариантах осуществления домен VHH, который связывается с CLEC12a, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99.

В различных вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит один, два, три или четыре домена VHH, которые связываются с CLEC12a.

В различных вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH, который связывается с CLEC12a, и по меньшей мере один домен VHH, который связывается с антигеном естественных киллерных клеток или Т-клеточным антигеном. В некоторых таких вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид может называться полиспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один представленный в настоящем изобретении домен VHH, слитый с Fc-участком. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 и 85.

В некоторых вариантах осуществления домен VHH, который связывается с CLEC12a, может быть гуманизированным. Гуманизированные антитела (такие как sdAb или VHH-содержащие полипептиды) полезны в качестве терапевтических молекул, поскольку гуманизированные антитела позволяют уменьшить или устранить возникновение иммунного ответа у человека на нечеловеческие антитела, которые могут вызывать иммунный ответ на терапевтическое антитело и снижать эффективность терапевтического антитела. Обычно гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых CDR (или их части) происходят из нечеловеческого антитела, а FR (или их части) происходят из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно также может содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Обзор гуманизированных антител и способов их получения представлен, например, в Almagro and Fransson (2008), *Front. Biosci.*, 13:1619-1633, они также описаны, например, в Riechmann et al. (1988), *Nature*, 332:323-329; Queen et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:10029-10033; патентах США № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al. (2005), *Methods*, 36:25-34; Padlan (1991), *Mol. Immunol.*, 28:489-498 (где описано "восстановление поверхности"); Dall'Acqua et al. (2005), *Methods*, 36:43-60 (где описана "перегруппировка FR"); и Osbourn et al. (2005), *Methods*, 36:61-68; и Klimka et al. (2000), *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (где описан подход "управляемого выбора" для перегруппировки FR).

Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают без ограничения каркасные области, выбранные с помощью метода "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. (1993), *J. Immunol.*, 151:2296); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител конкретной подгруппы переменных областей тяжелой цепи (см., например, Carter et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4285; и Presta et al. (1993), *J. Immunol.*, 151:2623); зрелые (соматически мутировавшие) человеческие каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro and Fransson (2008), *Front. Biosci.*, 13:1619-1633); и каркасные области, полученные из скрининговых библиотек FR (см., например, Vasa et al. (1997), *J. Biol. Chem.*, 272:10678-10684; и Rosok et al. (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:22611-22618). Обычно для получения гуманизированного VHH области FR в VHH заменяют на человеческие области FR. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR человеческого FR заменены для улучшения одно или более свойств гуманизированного VHH. Домены VHH с такими замененными остатками в настоящем изобретении по-прежнему называются "гуманизированными".

В различных вариантах осуществления Fc-участок, включенный в CLEC12a-связывающий полипептид, представляет собой человеческий Fc-участок или происходит из человеческого Fc-участка.

В некоторых вариантах осуществления Fc-участок, включенный в CLEC12a-связывающий полипептид, происходит из человеческого Fc-участка и содержит делецию трех аминокислот в нижнем шарнире, соответствующую E233, L234 и L235 IgG1, именуемой в настоящем изобретении как "xELL Fc". Полипептиды xELL Fc не взаимодействуют с FcγR и, таким образом, называются "эффektorными молчащими" или "эффektorными нулевыми", однако в некоторых вариантах осуществления xELL Fc-участки связываются с FcRn и, следовательно, имеют увеличенный период полужизни и транзитоз, связанный с FcRn-опосредованной рециркуляцией.

В некоторых вариантах осуществления Fc-участок, включенный в CLEC12a-связывающий поли-

пептид, происходит из человеческого Fc-участка и содержит мутации M252Y и M428V, называемые в настоящем изобретении "Fc-YV". В некоторых вариантах осуществления такие мутации усиливают связывание с FcRn при кислом pH эндосомы (примерно 6,5), при этом теряют детектируемое связывание при нейтральном pH (примерно 7,2), что обеспечивает усиленную FcRn-опосредованную рециркуляцию и увеличенный период полужизни.

В некоторых вариантах осуществления Fc-участок, включенный в CLEC12a-связывающий полипептид, происходит из человеческого Fc-участка и содержит мутации, предназначенные для гетеродимеризации, которые в настоящем изобретении называются "выступом" и "впадиной". В некоторых вариантах осуществления Fc-участок "выступа" содержит мутацию T366W. В некоторых вариантах осуществления "впадина" Fc-участка содержит мутации T366S, L368A и Y407V. В некоторых вариантах осуществления Fc-участки, используемые для гетеродимеризации, содержат дополнительные мутации, такие как мутация S354C в первом члене гетеродимерной пары Fc, которая образует асимметричный дисульфид с соответствующей мутацией Y349C на втором члене гетеродимерной пары Fc. В некоторых вариантах осуществления один член гетеродимерной пары Fc содержит модификацию H435R или H435K для предотвращения связывания с белком А при сохранении связывания с FcRn. В некоторых вариантах осуществления один член гетеродимерной пары Fc содержит модификацию H435R или H435K, в то время как второй член гетеродимерной пары Fc не модифицирован по H435. В различных вариантах осуществления удерживаемый Fc-участок содержит модификацию H435R или H435K (в некоторых случаях, когда модификация H435R называется "впадиной-R"), тогда как Fc-участок выступа не содержит модификацию. В некоторых случаях мутация впадины-R улучшает очистку гетеродимера по сравнению с гомодимерными Fc-участками впадины, которые могут присутствовать.

Неограничивающие иллюстративные Fc-участки, которые можно использовать в CLEC12a-связывающем полипептиде, включают Fc-участки, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74-109.

Химерные рецепторы и сконструированные клетки.

В настоящем изобретении представлены химерные антигенные рецепторы (CAR), имеющие внеклеточный домен, содержащий один или более CLEC12a-связывающих доменов VHH, представленных в настоящем изобретении. Предлагаемые в настоящем изобретении конструкции CAR включают внеклеточный домен, содержащий один или более CLEC12a-связывающих доменов VHH, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область. Один или более CLEC12a-связывающих доменов VHH, которые образуют антигенсвязывающую единицу CAR, связываются или способны связывать, т.е. нацеливаются, CLEC12a с достаточной аффинностью так, что CAR является полезным в терапии для нацеливания на клетку или ткань, экспрессирующую CLEC12a.

CAR представляют собой синтетические рецепторы, обычно содержащие внеклеточный нацеливающий/связывающий фрагмент, который ассоциирован с одним или более сигнальными доменами в одной слитой молекуле, которая экспрессируется на поверхности клетки, такой как Т-клетка. Таким образом, CAR объединяют антиген-специфичность и свойства активации Т-клеток в одной слитой молекуле. CAR первого поколения обычно включали цитоплазматическую область γ -цепи рецептора CD3zeta или Fc1 в качестве сигнального домена. CAR первого поколения были протестированы на фазе I клинических испытаний у пациентов с раком яичников, раком почек, лимфомой и нейробластомой, где они вызывали умеренный ответ (обзор Sadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 21(2):215-223, 2009). CAR второго поколения, которые содержат сигнальные домены костимулирующей молекулы, такой как CD28 и CD3zeta, обеспечивают двойную передачу сигналов для направления комбинированных активирующих и костимулирующих сигналов. CAR третьего поколения являются более сложными с тремя или более сигнальными доменами (обзор Sadelain et al., *Cancer Discovery* (3), 388-398, 2013; и Dotti et al., *Immuno. Rev.*, 257(1), 1-36, 2014).

В некоторых вариантах осуществления представленный CAR содержит CLEC12a-связывающий домен VHH. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере два домена VHH, нацеленных на один или более антигенов. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен CAR содержит два или по меньшей мере два CLEC12a-связывающих домена VHH, обеспечивая, таким образом, двухвалентную молекулу. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен содержит два или по меньшей мере два CLEC12a-связывающих домена VHH, но связывается с разными эпитопами на CLEC12a. В таких случаях антигенсвязывающий домен содержит первый CLEC12a-связывающий домен VHH, который связывается с первым эпитопом CLEC12a, и второй домен VHH, который связывается со вторым эпитопом CLEC12a. Эпитопы могут перекрываться. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является бипаратопным, а CAR представляет собой бипаратопный CAR. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит два CLEC12a-связывающих домена VHH, которые связываются с одними и теми же эпитопами на CLEC12a.

Трансмембранный домен CAR, представленный в настоящем изобретении, представляет собой домен, который обычно пересекает или способен пересекать или проходить через плазматическую мембрану и связываться прямо или косвенно (например, через спейсер, такой как шарнирная последователь-

ность иммуноглобулина) с внеклеточным антигенсвязывающим доменом и эндоплазматическим участком, содержащим внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен CAR представляет собой трансмембранную область трансмембранного белка (например, трансмембранных белков типа I), искусственную гидрофобную последовательность или их комбинации. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен включает домен CD3zeta или трансмембранный домен CD28. Специалистам в данной области техники будут очевидны другие трансмембранные домены, которые могут быть использованы в связи с вариантами осуществления CAR, представленными в настоящем изобретении.

Внутриклеточная сигнальная область CAR, представленная в настоящем изобретении, содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов, которые передают сигнал Т-клетке при присоединении антигенсвязывающего домена CAR, например, при связывании антигена. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен, который является или содержит сигнальный домен ITAM. Иллюстративные внутриклеточные сигнальные домены включают, например, сигнальный домен, полученный из ζ -цепи комплекса Т-клеточного рецептора или любого из его гомологов (например, η -цепь, Fc γ RII и β -цепи, цепь MB 1 (Iga), B29 (Ig) цепь и т.д.), человеческую CD3-цепь, полипептиды CD3 (Δ , δ и ϵ), тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и т.д.), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и т.д.) и другие молекулы, участвующие в трансдукции Т-клеток, такие как CD2, CD5, OX40 и CD28. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из дзета-цепи человеческого CD3.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область CAR может дополнительно содержать внутриклеточный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы. В таких примерах такой сигнальный домен может усиливать активность CAR-Т-клеток, например, за счет увеличения пролиферации, выживания и/или развития клеток памяти, после антиген-специфического взаимодействия, например, по сравнению с CAR, который содержит только ITAM, содержащий сигнальный домен, например CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD1a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен происходит или получен из человеческого белка. В некоторых аспектах костимулирующий сигнальный домен происходит или получен из человеческого CD28 или человеческого CD137 (4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен происходит от CD28 или 41BB.

В конкретных вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную или спейсерную область, которая соединяет внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Эта шарнирная или спейсерная область может использоваться для достижения различной длины и гибкости получаемого CAR. Примеры шарнирной или спейсерной области, которые можно использовать, включают без ограничения Fc-фрагменты антител или их фрагменты или производные, шарнирные области антител или их фрагменты или производные, области CH2 антител, области CH3 антител, искусственные спейсерные последовательности, например пептидные последовательности или их комбинации. Специалистам в данной области техники будут очевидны другие шарнирные или спейсерные области, которые могут использоваться. В одном из вариантов осуществления шарнир представляет собой шарнир IgG4 или шарнир CD8A.

В некоторых вариантах осуществления спейсер и трансмембранный домен представляют собой шарнирный и трансмембранный домен, происходящие от CD8.

В настоящем изобретении также предоставлена выделенная конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, как предусмотрено в настоящем изобретении. В некоторых аспектах конструкция представляет собой вектор экспрессии для экспрессии CAR в клетке. Вектор экспрессии может быть вирусным вектором. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2013). Для переноса генов в клетки млекопитающих разработан ряд вирусных систем. Например, используются ретровирусы, такие как аденовирусные векторы. В одном из вариантов осуществления используется лентивирусный вектор.

В дополнительном аспекте также предоставлена выделенная клетка или популяция клеток, содержащая одну или более конструкций нуклеиновых кислот, описанных выше. Также представлена выделенная клетка или популяция клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, представленного в настоящем изобретении. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены генно-инженерные клетки, которые содержат, например, стабильно экспрессируют CAR, представленный в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления клетку выбирают из группы, состоящей из Т-клетки, естественной киллерной (NK) клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, гемопоэтических стволовых клеток и/или плюрипотентных эмбриональных/индуцированных

стволовых клеток. В некоторых случаях клетка является Т-клеткой, такой как CD4 и/или CD8 Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными по отношению к субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть выделены от пациента (также называемые первичными Т-клетками) для инженерии, например трансфекции или трансдукции конструкцией CAR, состоящей из нуклеиновой кислоты.

В иллюстративном примере первичные Т-клетки могут быть очищены *ex vivo* (CD4 клетки или CD8 клетки или те и другие) и стимулированы агонистами TCR/CD28, такими как гранулы, покрытые анти-CD3 анти-CD28 антителами. После 2- или 3-дневного процесса активации рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий CAR, может быть стабильно введен в первичные Т-клетки с помощью стандартных протоколов лентивирусной или ретровирусной трансдукции или стратегии плазмидной электропорации. Клетки можно контролировать в отношении экспрессии CAR, например, с помощью проточной цитометрии с использованием антиэпитопной метки или антител, которые перекрестно реагируют с нативной родительской молекулой. Т-клетки, которые экспрессируют CAR, могут быть обогащены путем сортировки с помощью меченых антиэпитопных антител или могут быть обогащены для получения высокого или низкого уровня экспрессии в зависимости от применения.

CAR генно-инженерные Т-клетки могут быть проанализированы для оценки соответствующей функции различными способами. В некоторых случаях для оценки функции сконструированных Т-клеток может использоваться анализ *in vitro* цитотоксичности, пролиферации или цитокинов (например, экспрессии IFN-гамма). Иллюстративными стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированных Т-клеток или экспрессия IFN-гамма белка в супернатанте культуры. В некоторых случаях способность стимулировать активацию Т-клеток при стимуляции CAR, например через антиген, можно оценить, например, путем мониторинга экспрессии маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD62L, пролиферации и/или продуцирования цитокинов.

Экспрессия и продуцирование полипептидов.

Представлены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют CLEC12a-связывающий полипептид. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может также кодировать лидерную последовательность, которая управляет секрецией CLEC12a-связывающего полипептида, причем эта лидерная последовательность обычно отщепляется, и следовательно она не присутствует в секретируемом полипептиде. Лидерная последовательность может быть лидерной последовательностью нативной тяжелой цепи (или VHH) или может быть другой гетерологичной лидерной последовательностью.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы с помощью методов рекомбинантной ДНК, общепринятых в данной области. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор экспрессии, который подходит для экспрессии в выбранной клетке-хозяине.

Представлены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют CLEC12a-связывающие полипептиды, представленные в настоящем изобретении. Такие векторы включают без ограничения ДНК-векторы, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.д. В некоторых вариантах осуществления выбирают вектор, который оптимизирован для экспрессии полипептидов в желаемом типе клеток, таких как CHO клетки или клетки, полученные из CHO, или клетках NSO. Примеры таких векторов описаны, например, в Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.*, 20:880-889 (2004).

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид может экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как клетки грибов (таких как дрожжи), клетки растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такая экспрессия может осуществляться, например, в соответствии с процедурами, известными в данной области. Примеры эукариотических клеток, которые можно использовать для экспрессии полипептидов, включают, без ограничения клетки COS, включая клетки COS 7; клетки 293, включая клетки 293-6E; клетки CHO, включая клетки CHO-S, DG44.Lec13 CHO и клетки FUT8 CHO; клетки PER.C6® (Crucell); и клетки HCO. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающие полипептиды могут экспрессироваться в дрожжах. См., например, публикацию заявки на патент США № US 2006/0270045 A1. В некоторых вариантах осуществления конкретную эукариотическую клетку-хозяин выбирают на основе ее способности производить желаемые посттрансляционные модификации полипептида. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки CHO продуцируют полипептиды, которые имеют более высокий уровень сиа-лирования, чем тот же полипептид, продуцируемый в клетках 293.

Введение одной или более нуклеиновых кислот (таких как векторы) в желаемую клетку-хозяин может быть выполнено любым способом, включая, помимо прочего, трансфекцию с фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную катионными липидами, электропорацию, трансдукцию, инфекцию и т.д. Неограничивающие примеры способов описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты можно временно или стабильно трансфицировать в желаемые клетки-хозяева любым подходящим способом.

Также представлены клетки-хозяева, содержащие любую из нуклеиновых кислот или векторов,

раскрытых в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления представлена клетка-хозяин, которая экспрессирует CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении. CLEC12a-связывающие полипептиды, экспрессируемые в клетках-хозяевах, можно очистить любым подходящим методом. Такие методы включают без ограничения использование аффинных матриц или хроматографию гидрофобного взаимодействия. Подходящие аффинные лиганды включают ROR1 ECD и агенты, которые связывают Fc-участки. Например, для связывания Fc-участка и очистки CLEC12a-связывающего полипептида, который содержит Fc-участок, может быть использована колонка с белком А, белком G, белком A/G или колонка с иммобилизованным антителом. Для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела также может подходить гидрофобная интерактивная хроматография, например, на бутильной или фенильной колонке. Для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела, также может подходить ионообменная хроматография (например, анионообменная хроматография и/или катионообменная хроматография). Для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела, также может подходить смешанная хроматография (например, обращенно-фазовая/анионообменная, обращенно-фазовая/катионообменная, гидрофильного взаимодействия/анионообменная, гидрофильного взаимодействия/катионообменная и т.д.). В данной области техники известны многие методы очистки полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид продуцируется в бесклеточной системе. Неограничивающие примеры бесклеточных систем описаны, например, в Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.*, 498:229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.*, 22:538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.*, 21:695-713 (2003).

В некоторых вариантах осуществления представлены CLEC12a-связывающие полипептиды, полученные описанными выше способами. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид получают в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид получают в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид очищают. В некоторых вариантах осуществления представлена среда для культивирования клеток, содержащая CLEC12a-связывающий полипептид.

В некоторых вариантах осуществления представлены композиции, содержащие антитела, полученные описанными выше способами. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит CLEC12a-связывающий полипептид, полученный в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит CLEC12a-связывающий полипептид, полученный в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит очищенный CLEC12a-связывающий полипептид.

Иллюстративные способы лечения заболеваний с использованием CLEC12a-связывающих полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения заболевания у индивидуума, включающие введение CLEC12a-связывающего полипептида или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающий полипептид. В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения рака у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения CLEC12a-экспрессирующего или CLEC12a-положительного рака у индивидуума. Способ включает введение индивиду эффективного количества CLEC12a-связывающего полипептида или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид используется для переноса цитотоксического агента в CLEC12a-экспрессирующую клетку. В некоторых таких вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид содержит связывающий домен, который связывается с цитотоксической Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых таких вариантах осуществления связывающий домен связывается с CD3, Т-клеточным рецептором (TCR) α , TCR β , CD28, CD16, CD32A, CD64, CD89, NKp46 или NKG2D. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен может быть доменом V_HH или связывающим доменом антитела, содержащим варируемую область тяжелой цепи и варируемую область легкой цепи, такую как V_H/V_L, scFv, фрагмент Fab и т.д.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид связан с цитотоксическим агентом с образованием иммуноконъюгата. В данной области известны различные используемые в иммуноконъюгатах цитотоксические агенты, которые включают без ограничения калихеамицины, ауритатины, доластатины, тубулицины, майтанзиноиды, криптофицины, дуокармицины, эсперамицины, пирролобензодиазепины и эндиновые антибиотики.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид представляет собой химерный антигенный рецептор, экспрессируемый на цитотоксической клетке, такой как Т-клетка (CAR-T) или NK-клетка (CAR-NK). Такие методы лечения могут применяться у людей или животных. В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения людей.

Неограничивающие иллюстративные виды рака, которые можно лечить с помощью CLEC12a-связывающих полипептидов или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающие полипептиды, представленные в настоящем изобретении, включают без ограничения лимфому; лимфому Ходжкина; неходжкинскую лимфому; В-клеточную лимфому; низкой степени злокачественности/фолликулярную неход-

жнинскую лимфому (НХЛ); НХЛ из малых лимфоцитов (МЛ); средней степени злокачественности/фоликулярную НХЛ; диффузную НХЛ средней степени тяжести; иммунобластную НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластную НХЛ высокой степени злокачественности; НХЛ из мелких нерасщепленных клеток с высокой степенью злокачественности; объемную НХЛ; лимфому из клеток мантийной зоны; лимфому, связанную со СПИДом; макроглобулинемию Вальденстрема; острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); хронический лимфолейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак является CLEC12a-экспрессирующим (т.е. CLEC12a-положительным раком).

CLEC12a-связывающие полипептиды или клетки, экспрессирующие CLEC12a-связывающие полипептиды, можно вводить при необходимости субъектам. Определение частоты введения может быть выполнено специалистами в данной области, такими как лечащий врач, с учетом состояния, подлежащего лечению, возраста субъекта, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, общего состояния здоровья пациента, подлежащего лечению, и т.п. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу CLEC12a-связывающих полипептидов или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающие полипептиды, вводят субъекту один или более раз. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу CLEC12a-связывающих полипептидов или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающие полипептиды, вводят субъекту ежедневно, раз в неделю, еженедельно, каждые две недели, один раз в месяц и т.д. Эффективную дозу CLEC12a-связывающего полипептида или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающий полипептид, вводят субъекту по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу CLEC12a-связывающего полипептида или клеток, экспрессирующих CLEC12a-связывающий полипептид, можно вводить несколько раз, в том числе несколько раз в течение по меньшей мере месяца, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере года.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения (включая профилактику) рака. Терапевтически эффективное количество обычно зависит от веса субъекта, подвергаемого лечению, его или ее физического состояния или состояния здоровья, степени распространенности состояния, подлежащего лечению, или возраста субъекта, подлежащего лечению. Обычно антитела можно вводить в количестве от примерно 0,05 мг/кг веса тела до примерно 100 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 10 мкг/кг веса тела до примерно 100 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 50 мкг/кг веса тела до примерно 5 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 100 мкг/кг веса тела до примерно 10 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 100 мкг/кг веса тела до примерно 20 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 0,5 мг/кг веса тела до примерно 20 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 0,5 мг/кг веса тела до примерно 10 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 0,05 мг/кг веса тела до примерно 10 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 0,05 мг/кг веса тела до примерно 10 мг/кг веса тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 5 мг/кг массы тела или менее, например, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 мг/кг антитела.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающие полипептиды или клетки, экспрессирующие CLEC12a-связывающие полипептиды, можно вводить *in vivo* различными путями, включая без ограничения внутривенным, внутриартериальным, парентеральным, внутрибрюшинным или подкожным. Подходящий состав и путь введения могут быть выбраны в соответствии с целевым применением.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое лечение с использованием CLEC12a-связывающего полипептида достигается путем нацеливания цитотоксического агента на CLEC12a-экспрессирующую клетку, такую как CLEC12a-экспрессирующая раковая клетка. В некоторых таких вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид представляет собой химерный антигенный рецептор, экспрессируемый на цитотоксической клетке, такой как Т-клетка или НК-клетка.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие CLEC12a-связывающие полипептиды, представлены в составах с широким спектром фармацевтически приемлемых носителей (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3 ed., Pharmaceutical Press (2000)). Доступны различные фармацевтически приемлемые носители, которые включают носители, адъюванты и разбавители. Кроме того, также доступны различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как регуляторы pH и буферные агенты, агенты, регулирующие тоничность, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п. Неограничивающие иллюстративные носители включают физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глице-

рин, этанол и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит CLEC12a-связывающий полипептид в концентрации по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 мг/мл.

Комбинированная терапия.

CLEC12a-связывающие полипептиды или сконструированные клетки по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения, такими как другие противораковые средства. Они могут быть предоставлены до, по существу одновременно с другими способами лечения или после них (т.е. одновременно или последовательно). В некоторых вариантах осуществления способ лечения, представленный в настоящем изобретении, может дополнительно включать введение: лучевой терапии, химиотерапии, вакцинации, направленной противоопухолевой терапии, CAR-T-клеточной терапии, онколитической вирусной терапии, иммунотерапии рака, цитокинотерапии, хирургической резекции, модификации хроматина, абляции, криотерапии, антисмыслового агента против опухолевой мишени, миРНК агента против опухолевой мишени, микроРНК агента против опухолевой мишени или противоракового/опухолевого средства или биологического средства, такого как антитело, цитокин или белок слияния Fc-внеклеточный рецепторный домен.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид, представленный в настоящем изобретении, вводят одновременно с одним или более химиотерапевтическими средствами, CAR-T клеточной (T-клеточным химерным антигенным рецептором) терапией, онколитической вирусной терапией, терапией цитокинами и/или агентами, нацеленными на другие молекулы контрольных точек, такие как VISTA, gpNMB, B7H4, HHLA2, CD73, CTLA4, TIGIT и т.д.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированные клетки по настоящему изобретению используют в комбинации с другими противоопухолевыми средствами, такими как анти-HER-2 антитела, анти-CD20 антитела, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (например, эрлотиниб (TARCEVA®), ингибиторы тромбоцитарного фактора роста (например, GLEEVEC® (Imatinib Mesylate)), ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, ингибиторы CTLA4 (например, анти-CTLA антитело ипилимумаб (YERVOY®)), ингибиторы PD-1 (например, анти-PD1 антитела, BMS-936558), ингибиторы PDL1 (например, анти-PDL1 антитела, MPDL3280A), ингибиторы PDL2 (например, анти-PDL2 антитела), цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более из следующих мишеней ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA, PD-1, PDL1, PDL2, CTLA4 или рецептор(ы) VEGF, TRAIL/Apo2, и другие биоактивные и органические химические агенты и т.д.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку, представленные в настоящем изобретении, вводят одновременно с PD-1/PD-L1 терапией. Примеры PD-1/PD-L1 терапии включают ниволумаб (BMS); пидилизумаб (CureTech, CT-011), пембролизумаб (Merck); дурвалумаб (Medimmune/AstraZeneca); атезолизумаб (Genentech/Roche); авелумаб (Pfizer); AMP-224 (Amplimmune); BMS-936559; AMP-514 (Amplimmune); MDX-1105 (Merck); TCP-042 (Tesar/AnaplysBio, ANB-011); STI-A1010 (Sorrento Therapeutics); STI-A1110 (Sorrento Therapeutics); и другие агенты, которые направлены против белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) или лиганда запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-L1).

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированная клетка по настоящему изобретению может использоваться в комбинации с химиотерапевтическим средством. Примеры химиотерапевтических средств включают без ограничения алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилендиофосфорамида и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотecin (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динемистин, включая динемистин А, бисфосфонаты; такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеиновые энединовые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN® доксоруби-

цин (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, нагаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностагин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митоган, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразрин; пентостагин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофилиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ состав без кремафора, содержащий связанный с альбумином паклитаксел в виде наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), TAXOTERE® доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабин GEMZAR®; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; эпопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; NAVELBINE® винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; иринотекан (камптозар, СРТ-11) (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибиторы топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбретагестин; лейковорин (LV); оксалиплатин, включая схему лечения оксалиплатином (FOLFOX); ингибиторы PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (например, эрлотиниб (TARCEVA®)) и VEGF-A, которые уменьшают пролиферацию клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

Дополнительные неограничивающие иллюстративные химиотерапевтические средства включают антигормональные агенты, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на рак, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен FARESTON®; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующую выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат MEGASE®, AROMASIN® экземестан, форместание, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол и ARIMIDEX® анастрозол; и андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (цитозиновый аналог 1,3-диоксоланового нуклеозида); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности такие, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, такие как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим ANGIOZYME®) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; PROLEUKIN® (альдеслейкин) rIL-2; LURTOTECAN® ингибитор топоизомеразы 1; АВARELIX® агонист GnRH; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид и дополнительный агент составляют единую терапевтическую композицию, и CLEC12a-связывающий полипептид и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированная клетка и дополнительный агент отделены друг от друга, например, каждый приготовлен в виде отдельной терапевтической композиции, и CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент вводят одновременно, или CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент вводят в разное время согласно схеме лечения. Например, CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят до введения дополнительного агента, CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят после введения дополнительного агента, или CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент вводят поочередно. CLEC12a-связывающий полипептид и дополнительный агент можно вводить в виде однократных или многократных доз.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент(ы) вводят одновременно. Например, CLEC12a-связывающий полипептид и дополнительный агент(ы) могут быть составлены в виде одной композиции или могут вводиться в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент(ы) вводят последовательно, или CLEC12a-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительный агент вводят в разное время согласно схеме лечения.

Неограничивающие иллюстративные способы диагностики и лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, полезны для оценки субъекта и/или полученного от субъекта (например, больного раком) образца. В некоторых вариантах осуществления оценка представляет собой одно или более из следующего: диагноз, прогноз и/или ответ на лечение.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, включают оценку наличия, отсутствия или уровня белка. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, включают оценку наличия, отсутствия или уровня экспрессии нуклеиновой кислоты. Для этих измерений могут быть использованы представленные в настоящем изобретении композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, включают контактирование образца опухоли или клеток, культивируемых из опухоли, с терапевтическим агентом, представленным в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления оценка позволяет направлять лечение (включая лечение антителами, представленными в настоящем изобретении). В некоторых вариантах осуществления оценка позволяет определять применение или отказ от адъювантной терапии после резекции. Адъювантная терапия, также называемая адъювантным лечением, представляет собой лечение, которое проводится дополнительно к первичному, основному или начальному лечению. В качестве неограничивающего примера адъювантная терапия может быть дополнительным лечением, обычно проводимым после хирургического вмешательства, результате которого удалены все детектируемые заболевания, но сохраняется статистический риск рецидива ввиду скрытого заболевания. В некоторых вариантах осуществления полипептиды используются в качестве адъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления полипептиды используются в качестве единственной адъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, представленные в настоящем изобретении, не используются в качестве адъювантной терапии при лечении рака. Например, если ответ пациента на представленное в настоящем изобретении антитело является маловероятным, или ответ будет минимальным, то в интересах качества жизни и во избежание ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических препаратов лечение может быть не назначено. В таких случаях можно использовать паллиативную помощь.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды вводят в качестве неоадъювантной терапии перед резекцией. В некоторых вариантах осуществления неоадъювантная терапия относится к терапии, направленной на сокращение и/или снижение степени опухоли перед любой операцией. В некоторых вариантах осуществления неоадъювантная терапия означает химиотерапию, назначаемую больным раком перед операцией. В некоторых вариантах осуществления неоадъювантная терапия означает, что антитело вводят больным раком до операции. Типы рака, при которых обычно предусмотрена неоадъювантная химиотерапия, включают, например, рак груди, толстой кишки, яичников, шейки матки, мочевого пузыря и легких. В некоторых вариантах осуществления полипептиды применяют в качестве неоадъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления такое применение осуществляется перед резекцией.

В некоторых вариантах осуществления микросреда опухоли, рассматриваемая в способах, представленных в настоящем изобретении, представляет собой одно или более из: сосудистой сети опухоли; инфильтрирующих опухоль лимфоцитов; фибробластных ретикулярных клеток; эндотелиальных клеток-предшественников (EPC); ассоциированных с раком фибробластов; перицитов; других стромальных клеток; компонентов внеклеточного матрикса (ECM); дендритных клеток; антигенпрезентирующих клеток; Т-клеток; регуляторных Т-клеток; макрофагов; других лимфоидных клеток; нейтрофилов; и других иммунных клеток, расположенных проксимальнее опухоли.

Наборы.

Также представлены изделия и наборы, которые включают любой из CLEC12a-связывающих полипептидов, представленных в настоящем изобретении, и подходящую упаковку. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает набор с (i) CLEC12a-связывающим полипептидом и (ii) инструкциями по использованию набора для введения CLEC12a-связывающего полипептида индивиду.

Подходящая упаковка для представленных в настоящем изобретении композиций известна в данной области и включает, например, флаконы (например, герметичные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Эти изделия можно дополнительно стерилизовать и/или запечатывать. Также предусмотрены стандартные лекарственные формы, содержащие представленные в настоящем изобретении композиции. Эти единич-

ные дозированные формы могут храниться в подходящей упаковке в виде одной или более единичных доз, а также могут быть дополнительно стерилизованы и запечатаны. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, на листе бумаги, входящем в комплект), но также возможны машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом запоминающем диске). Инструкции, относящиеся к применению антител, обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования и способе введения для целевого лечения или промышленного использования. Набор может дополнительно содержать описание выбора подходящего индивидуума или лечения.

Контейнеры могут быть единичными дозами, объемными упаковками (например, многодозовыми упаковками) или субъединичными дозами. Например, также могут быть представлены наборы, которые содержат достаточные дозы представленных в настоящем изобретении молекул для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода, например, примерно в течение 1, 2, 3, 4, 6, 8 недель, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 месяцев или более. Наборы также могут включать несколько единичных доз молекул и инструкции по применению и могут быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках, например, в больничных аптеках и аптеках по приготовлению рецептов. В некоторых вариантах осуществления набор включает сухую (например, лиофилизированную) композицию, которую можно восстановить, ресуспендировать или регидратировать с образованием, как правило, стабильной водной суспензии антитела.

Примеры

Обсуждаемые ниже примеры предназначены исключительно для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Примеры не предназначены для демонстрации того, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными выполненными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, и давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Анти-CLEC12a однодоменные антитела.

Однодоменные антитела, нацеленные на человеческий CLEC12a, получали путем иммунизации лам и альпаков рекомбинантной версией внеклеточного домена человеческого CLEC12a.

После создания титров специфических анти-CLEC12a антител мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) ламы/альпаки выделяли из 500 мл крови иммунизированного животного, и общую мРНК выделяли с использованием набора Qiagen RNeasy Maxi Kit и затем трансформировали в первую нить кДНК с помощью обратной транскриптазы Thermo Superscript IV и примирования олиго-dT. Последовательности VHH специфически амплифицировали с помощью ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы и клонировали в вектор в дрожжевые клетки в виде слитых белков VHH-Fc-AGA2 для их отображения на поверхности дрожжей.

Библиотеки дрожжевых клонов, отображающие слитые белки VHH-Fc-AGA2, обогащали с использованием рекомбинантных форм ECD CLEC12a путем выделения магнитных гранул с последующей сортировкой активированных флуоресценцией клеток (FACS). Отсортированные дрожжевые клетки высеивали, и изолированные колонии собирали в 96-луночные блоки и выращивали в среде, которая переключала экспрессию с VHH-Fc, отображаемого на поверхности, на его секрецию в среду. Супернатанты из 96-луночных дрожжевых секретных культур наносили на клетки 293F, временно трансфицированные CLEC12a (положительные по CLEC12a) или нетрансфицированные клетки 293F (отрицательные по CLEC12a), промывали, обрабатывали мечеными флуорофором вторичными антителами к Fc человеческого IgG1 и анализировали проточной цитометрией в 96-луночной планшете.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие VHH, которые связывались с CLEC12a-положительными клетками, а не с CLEC12a-отрицательными клетками, клонировали в рамке считывания с областью, кодирующей человеческий Fc, в векторы экспрессии млекопитающих и экспрессировали с помощью временной трансфекции в клетках HEK293 Freestyle (клетки 293F) или клетках CHO с использованием полиэтиленмина. Супернатант собирали через 3-7 дней, секретированный рекомбинантный белок очищали хроматографией с белком А, и вычисляли концентрацию по оптической плотности при 280 нм и коэффициенту экстинкции.

Эпитопы однодоменных антител (sdAb), содержащие домены VHH, которые связывались с CLEC12a, сравнивали с помощью биослойной интерферометрии. 7 мкг/мл mFc-CLEC12a-ECD (SEQ ID NO: 87) иммобилизовали на сенсорах захвата, покрытых анти-mFc антителами. Затем 100 нМ одного sdAb загружали на антиген CLEC12a и оставляли до достижения равновесного состояния. Затем датчики переносили в 100 нМ второго sdAb. Усиление анализируемого сигнала означало связывание, указывая на то, что второй sdAb нацелен на эпитоп, отличный от эпитопа первого sdAb.

Происходящие из верблюда VHH CLEC12a гуманизировали, используя в качестве каркаса человеческую зародышевую линию VH3-23. Остатки верблюда, влияющие на растворимость, специфичность, стабильность и/или аффинность, оставались немодифицированными. Кроме того, где это возможно и по

мере необходимости, аминокислотные последовательности, которые обладали потенциальной проявляющей способностью, изменяли, чтобы уменьшить риск этого события. Помимо этого, все гуманизированные варианты содержали модификацию Leu11Glu (L11E), как описано в US 20160207981.

Результаты показывают, что среди гуманизированных версий sdAb MB11, ME06, MC02, MH07, MC06 и ME02 были обнаружены три различных эпитопа. Как показано на фиг. 1А, sdAb hzME02v4 и hzME06v16 имеют эпитопы, отличные от эпитопов для sdAbs hzMB11v13, hzMC02v6, hzMН07v3 и hzMC06v2. Как показано на фиг. 1В, ни одно из sdAb hzME06v16, hzME02v4 и hzMB11v13 не имеет общего эпитопа. Суммарные результаты представлены ниже в табл. 3.

Таблица 3

| sdAb | Эпитопная группа |
|-----------|------------------|
| hzMB11v13 | 1 |
| hzME06v16 | 2 |
| hzMC02v6 | 1 |
| hzMН07v3 | 1 |
| hzMC06v2 | 1 |
| hzME02v4 | 3 |

Пример 2. Связывание полипептидов с CLEC12a.

Связывание sdAb с человеческим CLEC12a оценивали с помощью проточной цитометрии. Каждый sdAb содержал домен VHH, как показано в табл. 4 ниже, и xELL Fc-область человеческого IgG1, в которой были удалены аминокислоты Glu233, Leu234 и Leu235 в соответствии с нумерацией EU (SEQ ID NO: 1). Клетки HEK 293 временно трансфицировали плазмидой, кодирующей CLEC12a (номер доступа в базе данных UniProt Q5QGZ9.3; SEQ ID NO: 1) и использовали в качестве положительной клеточной линии, а нетрансфицированные HEK 293 клетки использовали в качестве CLEC12a-отрицательных клеток. Каждый тип клеток высевали из расчета 30000 клеток/лунку в буфере FACS (PBS, 1% BSA, 0,1% NaN₃, pH 7,4) на 96-луночный круглодонный планшет. SdAb разводили в буфере для FACS путем 3-кратного 11-точечного серийного разведения. Разведения sdAb добавляли к посеянным клеткам, и аналитические планшеты инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После двукратной промывки в 150 мкл буфера FACS клетки в каждой лунке ресуспендировали в 100 мкл конъюгированного с Alexa Fluor 647 вторичного античеловеческого антитела IgG, разведенного 1:2000 в буфере FACS и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали два раза, затем связанное антитело детектировали проточной цитометрией.

Анализ методом проточной цитометрии выполняли на Intellicyte iQue Plus, и значения флуоресценции наносили на график в виде медианной интенсивности флуоресценции. Кажущуюся аффинность (K_d, нМ) определяли с помощью нелинейной регрессии связывания одного участка, используя графическое программное обеспечение PRISM.

Как видно на фиг. 2А-2L, протестированные sdAb показали связывание с CLEC12a, но не связывались или демонстрировали минимальное связывание с нетрансфицированными HEK 293 клетками, не экспрессирующими CLEC12a. Кажущаяся аффинность связывания приведена в табл. 4 ниже.

Таблица 4

| sdAb | Кажущаяся K _d (нМ) | SEQ ID NO домена VHH |
|-----------|-------------------------------|----------------------|
| MB11 | 58,6 | 2 |
| hzMB11v13 | 0,3 | 26 |
| ME06 | 0,05 | 18 |
| hzME06v16 | 0,06 | 30 |
| MC02 | 0,37 | 6 |
| hzMC02v6 | 0,35 | 27 |
| MН07 | 0,10 | 22 |
| hzMН07v3 | 0,28 | 31 |
| MC06 | 1,58 | 10 |
| hzMC06v2 | 13,98 | 28 |
| ME02 | 1,2 | 14 |
| hzME02v4 | 0,87 | 29 |

Изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных характеристик. Следовательно, вышеизложенные варианты осуществления следу-

ет рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение. Объем изобретения, таким образом, определен прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и следовательно все изменения, охватываемые значением и диапазоном эквивалентности формулы изобретения, входят в объем изобретения.

Таблица некоторых последовательностей

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|----------------------|---|
| 1 | Человеческий CLEC12a | MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEIGKFG EK APPAPSHVWR PAALFLTLLC LLLIGLGLV L ASM FHVTLKI EMKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTL QTIATKLCRE LYSKEQEHC KPCRRWIWH KDSCYFLSDD VQWQESKMA CAAQNASLLK INNKNLEFI KSQRSYDYW LGLSPEEDST RGM RVDNIIN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI NRLYVQYYHC TYKKRMICEK MANPVQLGST YFREA |
| 2 | MB11 | QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGFLFSIYDMN WYRQA PGKEREWIAGITNNGYSTAYTDSVQGRFTISRDN AKNTIYL QMTSLKPEDTAVYYCHADLTKCYDGEYAWGQGTQVTV |
| 88 | MB11 К вариант | QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGFLFSIYDMN WYRQA PGKEREWIAGITNNGYSTAYTDSVQGRFTISRDN AKNTIYL QMTSLKPEDTAVYYCHADLTKCYDGEYAWGQGTQVTVK |
| 3 | MB11 CDR1 | GFLFSIYDMN |
| 4 | MB11 CDR2 | GITNNGYSTA |
| 5 | MB11 CDR3 | DLTKCYDGEYA |
| 6 | MC02 | QVQLVQSGGGLAQPGGSLRLSCTASGFTFRINDMGWYRQA PGKECEMVAGISNNGFSTAYADSVKGRFTISRDN AKNTVSL QMDSLKSED TAVYYCHRTDDGAAHACSRGQGTQVTV |
| 89 | MC02 К вариант | QVQLVQSGGGLAQPGGSLRLSCTASGFTFRINDMGWYRQA PGKECEMVAGISNNGFSTAYADSVKGRFTISRDN AKNTVSL QMDSLKSED TAVYYCHRTDDGAAHACSRGQGTQVTVK |
| 7 | MC02 CDR1 | GFTFRINDMG |
| 8 | MC02 CDR2 | GISNNGFSTA |
| 9 | MC02 CDR3 | TDDGAAHACS |
| 10 | MC06 | QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSVYDMN WYRQ TPGKEREWVAGISNNGFSTAYAGSVKGRFTISRDN AENTVY LQMNSLKSED TAVYYCNLDVHGRVGAQGDYWGQGTQVT V |
| 90 | MC06 К вариант | QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSVYDMN WYRQ TPGKEREWVAGISNNGFSTAYAGSVKGRFTISRDN AENTVY LQMNSLKSED TAVYYCNLDVHGRVGAQGDYWGQGTQVT VK |
| 11 | MC06 CDR1 | GFTFSVYDMN |
| 12 | MC06 CDR2 | GISNNGFSTA |
| 13 | MC06 CDR3 | DVHGRVGAQGDY |

| | | | |
|----|-------------------------|---|--|
| 14 | ME02 | | QVQLQQSGGGLVQVGGSQLRSCAASGRTFEYDDMVWFRQ APGKEREEVAGISWSGGSIYYADSVKGRFSISRDNANTVY LEMNRLKPEDTAVYYCNVGSYWGQGTQVTV |
| 91 | ME02 вариант | K | QVQLQQSGGGLVQVGGSQLRSCAASGRTFEYDDMVWFRQ APGKEREEVAGISWSGGSIYYADSVKGRFSISRDNANTVY LEMNRLKPEDTAVYYCNVGSYWGQGTQVTVK |
| 15 | ME02 CDR1 | | GRTFEYDDMV |
| 16 | ME02 CDR2 | | GISWSGGSIY |
| 17 | ME02 CDR3 | | GSY |
| 18 | ME06 | | QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCVASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVSCISNSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYL HVNSLNPEDTAVYYCALREGLPLLLDSLWRQPVEYDYWGQ GTQVTV |
| 92 | ME06 вариант | K | QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCVASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVSCISNSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYL HVNSLNPEDTAVYYCALREGLPLLLDSLWRQPVEYDYWGQ GTQVTVK |
| 19 | ME06 CDR1 | | GFTFDDYAIG |
| 20 | ME06 CDR2 | | CISNSDGSTY |
| 21 | ME06 CDR3 | | REGLPLLLDSLWRQPVEYDY |
| 22 | MH07 | | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGLLFSIYDMNWYRQA PGKEREWIAGITNNGYSTAYTDSVQGRFTISRDNANTVYL QMNSLKPEDTAVYYCHTDEWGREYWGQGTQVTV |
| 93 | MH07 вариант | K | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGLLFSIYDMNWYRQA PGKEREWIAGITNNGYSTAYTDSVQGRFTISRDNANTVYL QMNSLKPEDTAVYYCHTDEWGREYWGQGTQVTVK |
| 23 | MH07 CDR1 | | GLLFSIYDMN |
| 24 | MH07 CDR2 | | GITNNGYSTA |
| 25 | MH07 CDR3 | | DEWGREY |
| 26 | hzMB11v13 | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFLFSIYDMNWYRQA PGKEREWVAGITNNGYSTAYAESVKGRFTISRDNANTIYL QMSSLRAEDTAVYYCHADLTAKAYDVEYAWGQGTTLVTV |
| 94 | hzMB11v13 KP вариант | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFLFSIYDMNWYRQA PGKEREWVAGITNNGYSTAYAESVKGRFTISRDNANTIYL QMSSLRAEDTAVYYCHADLTAKAYDVEYAWGQGTTLVTVKP |
| 27 | hzMC02v6 | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFRINDMGWYRQA PGKECEMVAGISNNGFSTAYAESVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLRAEDTAVYYCHRTDEGAHAHACSRGQGTTLVTV |
| 95 | hzMC02v6 KP вариант | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFRINDMGWYRQA PGKECEMVAGISNNGFSTAYAESVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLRAEDTAVYYCHRTDEGAHAHACSRGQGTTLVTVKP |
| 28 | hzMC06v2 | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYDMNWYRQ APGKEREWVSGISNNGFSTAYAESVKGRFTISRDNANTLY LQMSSLRAEDTAVYYCNLDVHGRVGAQGDYWGQGTTLVTV |
| 96 | hzMC06v2 KP вариант | | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYDMNWYRQ APGKEREWVSGISNNGFSTAYAESVKGRFTISRDNANTLY LQMSSLRAEDTAVYYCNLDVHGRVGAQGDYWGQGTTLVTV KP |

| | | |
|----|----------------------|--|
| 29 | hzME02v4 | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRTFEYDDMVWFRQAPGKEREEVAGISWSGGSIYYAESVKGRFSISRDNANTVYLEMNRLKPEDTAVYYCNVGSYWGQGLVTV |
| 97 | hzME02v4 KP вариант | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRTFEYDDMVWFRQAPGKEREEVAGISWSGGSIYYAESVKGRFSISRDNANTVYLEMNRLKPEDTAVYYCNVGSYWGQGLVTVKP |
| 30 | hzME06v16 | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSTISSSDGSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCALREGLPLLLDTLWRQPVEYDYWGQGTQVTV |
| 98 | hzME06v16 KP вариант | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSTISSSDGSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCALREGLPLLLDTLWRQPVEYDYWGQGTQVTVKP |
| 31 | hzMH07v3 | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLLFSIYDMNWRQAPGKEREWVAGITNNGYSTAYAESVKGRFTISRDNANTVYLMSSLRAEDTAVYYCHTDEWGREYWGQGLVTV |
| 99 | hzMH07v3 KP вариант | EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLLFSIYDMNWRQAPGKEREWVAGITNNGYSTAYAESVKGRFTISRDNANTVYLMSSLRAEDTAVYYCHTDEWGREYWGQGLVTVKP |
| 32 | hzMB11v13 CDR1 | GFLFSIYDMN |
| 33 | hzMB11v13 CDR2 | GITNNGYSTA |
| 34 | hzMB11v13 CDR3 | DLTKAYDVEYA |
| 35 | hzMC02v6 CDR1 | GFTFRINDMG |
| 36 | hzMC02v6 CDR2 | GISNNGFSTA |
| 37 | hzMC02v6 CDR3 | TDEGAAHACS |
| 38 | hzMC06v2 CDR1 | GFTFSVYDMN |
| 39 | hzMC06v2 CDR2 | GISNNGFSTA |
| 40 | hzMC06v2 CDR3 | DVHGRVGAQGDY |
| 41 | hzME02v4 CDR1 | GRTFEYDDMV |
| 42 | hzME02v4 CDR2 | GISWSGGSIY |
| 43 | hzME02v4 CDR3 | GSY |
| 44 | hzME06v16 CDR1 | GFTFDDYAIG |
| 45 | hzME06v16 CDR2 | TISSSDGSTY |
| 46 | hzME06v16 CDR3 | REGLPLLLDTLWRQPVEYDY |

| | | |
|----|--|--|
| 47 | hzMH07v3 CDR1 | GLLFSIYDMN |
| 48 | hzMH07v3 CDR2 | GITNNGYSTA |
| 49 | hzMH07v3 CDR3 | DEWGREY |
| 50 | Fc-участок человеческого IgG1 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTFLHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 51 | xELL Fc- участок человеческого IgG1 | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTFLHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 52 | M252Y и M428V (YV) S354C T366W выступ Fc- участка | DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVVHE ALHNHYTQKS LSLSPGK |
| 53 | M252Y, M428V, H435R (YVR) T366S, L368A, Y407V впадина Fc- участка | DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVVHE ALHNRYTQKS LSLSPGK |
| 54 | H435R xELL Fc-участок | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTK KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 55 | M252Y и M428V (YV) xELL Fc- участок | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTK KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVVH EALHNHYTQK SLSLSPGK |

| | | |
|----|---|---|
| 56 | M252Y и M428L (YL) xELL Fc- участок | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVLH EALHNHYTQK SLSLSPGK |
| 57 | M252Y, M428L, H435R (YLR) xELL Fc- участок | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVLH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 58 | M252Y, M428V, H435R (YVR) xELL Fc- участок | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVVH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 59 | S354C T366W выступ xELL Fc-участка | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCRDEL KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK |
| 60 | H435R S354C T366W выступ xELL Fc-участка | DKTHTC PPCPAPGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCRDEL KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 61 | M252Y и M428V (YV) S354C T366W выступ xELL Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAQGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VVHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 62 | M252Y и M428L (YL) S354C T366W выступ xELL Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAQGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|----|--|--|
| 63 | M252Y, M428L, H435R (YLR) S354C T366W выступ хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VLHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 64 | M252Y, M428V, H435R (YVR) S354C T366W выступ хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VVHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 65 | T366S, L368A, Y407V впадина хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 66 | H435R, T366S, L368A, Y407V впадина хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 67 | M252Y и M428V (YV) T366S, L368A, Y407V впадина хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VVHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 68 | M252Y и M428L (YL) T366S, L368A, Y407V впадина хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VLHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 69 | M252Y, M428L, H435R (YLR) T366S, L368A, Y407V впадина хЕLЛ Fc-участка | DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VLHEALHNRYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|----|--|---|
| 70 | M252Y, M428V, H435R (YVR) T366S, L368A, Y407V впадина выступ хELL Fc-участка | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC S VVHEALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 71 | H435R Fc- участок | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 72 | M252Y и M428V (YV) Fc-участок | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 73 | M252Y и M428L (YL) Fc-участок | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 74 | M252Y, M428L, H435R (YLR) Fc-участок | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 75 | M252Y, M428V, H435R (YVR) Fc-участок | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLYISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 76 | S354C T366W выступ Fc- участка | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |

| | | | |
|----|--|-----|--|
| 77 | H435R S354C T366W выступ участка | Fc- | DKTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCRDEL KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL DSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK |
| 78 | M252Y и M428L (YL) S354C T366W выступ участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 79 | M252Y, M428L, H435R (YLR) S354C T366W выступ участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 80 | M252Y, M428V, H435R (YVR) S354C T366W выступ участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 81 | T366S, L368A, Y407V впадина участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 82 | H435R, T366S, L368A, Y407V впадина участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 83 | M252Y и M428V (YV) T366S, L368A, Y407V впадина участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 84 | M252Y и M428L (YL) T366S, L368A, Y407V впадина участка | Fc- | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|----|--|--|
| 85 | M252Y, M428L, H435R (YLR) T366S, L368A, Y407V впадина Fc- участка | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVLHEALHNRYTQKLSLSPGK |
| 86 | CLEC12a- ECD | TLKIEMKKMNKLQNISEELQRNLSLQMSNMNISNKIRNLS TTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCRRWIWHKDSYFLS DDVQVTWQESKMACAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSRYSYD YWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNMYCG YINRLYVQYYHCTYKCRMICEKMANPVQLGSTYFREA |
| 87 | mFc- CLEC12a- ECD | LEVLFGGPGSPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGSKFEKCKVNNRALPSPIEK TISKPRGPVRAQVYVLPPEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEI AVDWTNNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKST WERGSLFACSVVHEGLHNHLTKTISRSLGKGGTGGSTLKI EMKKMNKLQNISEELQRNLSLQMSNMNISNKIRNLSLTLQ TIATKLCRELYSKEQEHKCKPCRRWIWHKDSYFLSDDVQ TWQESKMACAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSRYSYDYLWLG LSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNMYCGYINRL YVQYYHCTYKCRMICEKMANPVQLGSTYFREA |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, который связывается с CLEC12a и который содержит

(a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;

(b) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 5;

(c) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 37;

(d) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

(e) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и/или

(f) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 45; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 46.

2. Полипептид по п.1, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

3. Полипептид по п.1 или 2, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 5.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 37.

5. Полипептид по любому из пп.1-4, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

6. Полипептид по любому из пп.1-5, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и/или

тельность SEQ ID NO: 17.

7. Полипептид по любому из пп.1-6, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 45; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 46.

8. Полипептид по любому из пп.1-7, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34; SEQ ID NO: 47, 48 и 49; SEQ ID NO: 32, 33 и 5; SEQ ID NO: 7, 8 и 9; SEQ ID NO: 11, 12 и 13; SEQ ID NO: 15, 16 и 17; SEQ ID NO: 19,20 и 21; SEQ ID NO: 7, 8 и 37; SEQ ID NO: 19, 45 и 46.

9. Полипептид по любому из пп.1-8, в котором по меньшей мере один домен VHH является гуманизированным.

10. Полипептид по любому из пп.1-9, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, 94, 31, 99, 27, 28, 29, 30, 95, 96, 97 или 98.

11. Полипептид по любому из пп.1-9, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 94, 31, 99, 27, 28, 29, 30, 95, 96, 97 или 98.

12. Полипептид по любому из пп.1-8, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

13. Полипептид по любому из пп.1-8, в котором по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

14. Полипептид по любому из пп.1-13, содержащий два домена VHH.

15. Полипептид по любому из пп.1-13, содержащий три домена VHH.

16. Полипептид по любому из пп.1-15, содержащий по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с антигеном, отличным от CLEC12a.

17. Полипептид по п.16, содержащий по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с CD3, Т-клеточным рецептором (TCR) α , TCR β , CD28, CD16, CD32A, CD64, CD89, NKp46 или NKG2D.

18. Полипептид по п.14 или 15, в котором каждый домен VHH связывается с CLEC12a.

19. Полипептид по п.18, в котором каждый домен VHH содержит одинаковые аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3.

20. Полипептид по п.18, в котором каждый домен VHH содержит одну и ту же последовательность VHH.

21. Полипептид по любому из пп.1-13, содержащий один домен VHH.

22. Полипептид по любому из пп.1-21, содержащий Fc-участок.

23. Полипептид по п.22, в котором Fc-участок содержит аминокислотную последовательность, выbranную из SEQ ID NO: 50-85.

24. Полипептид по п.22 или 23, который образует димер в физиологических условиях.

25. Полипептид по любому из пп.1-24, где CLEC12a представляет собой человеческий CLEC12a.

26. Полипептид по п.25, где человеческий CLEC12a содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

27. Иммуноконъюгат, содержащий полипептид по любому из пп.1-26 и цитотоксический агент.

28. Иммуноконъюгат по п.27, в котором цитотоксический агент выбирают из калихеамицина, аури-статина, доластатина, тубулицина, майтанзиноида, криптофицина, дуокармицина, эсперамицина, пирро-лобензодиазепина и эндиинового антибиотика.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-26 или иммуно-конъюгат по п.27 или 28 и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-26.

31. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.30.

32. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.30 или вектор по п.31.

33. Клетка-хозяин, которая экспрессирует полипептид по любому из пп.1-26.

34. Способ получения полипептида по любому из пп.1-26, содержащий инкубацию клетки-хозяина по п.32 или 33 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида.

35. Способ по п.34, дополнительно содержащий выделение полипептида.

36. Способ лечения рака, включающий введение страдающему раком субъекту фармацевтически эффективного количества полипептида по любому из пп.1-26, иммуноконъюгата по п.27 или 28 или фармацевтической композиции по п.29.

37. Способ по п.36, где рак выбирают из лимфомы; лимфомы Ходжкина; неходжкинской лимфомы; В-клеточной лимфомы; низкой степени злокачественности/фолликулярной неходжкинской лимфомы (НХЛ); НХЛ из малых лимфоцитов (МЛ); средней степени злокачественности/фолликулярной НХЛ; диффузной НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластной НХЛ высокой степени злокачест-

венности; лимфобластной НХЛ высокой степени злокачественности; НХЛ из мелких нерасщепленных клеток с высокой степенью злокачественности; объемной НХЛ; лимфомы из клеток мантийной зоны; лимфомы, связанной со СПИДом; макроглобулинемии Вальденстрема; хронического лимфолейкоза (ХЛЛ); острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); острого миелоидного лейкоза (ОМЛ); волосатоклеточного лейкоза; и хронического миелобластного лейкоза.

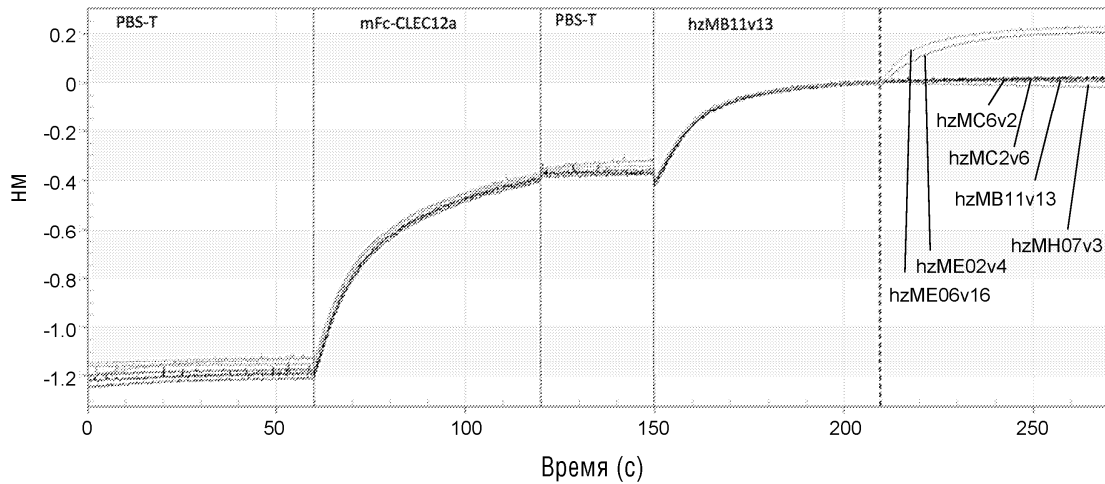
38. Способ по п.36 или 37, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

39. Способ по любому из пп.36-38, дополнительно содержащий введение дополнительного терапевтического агента.

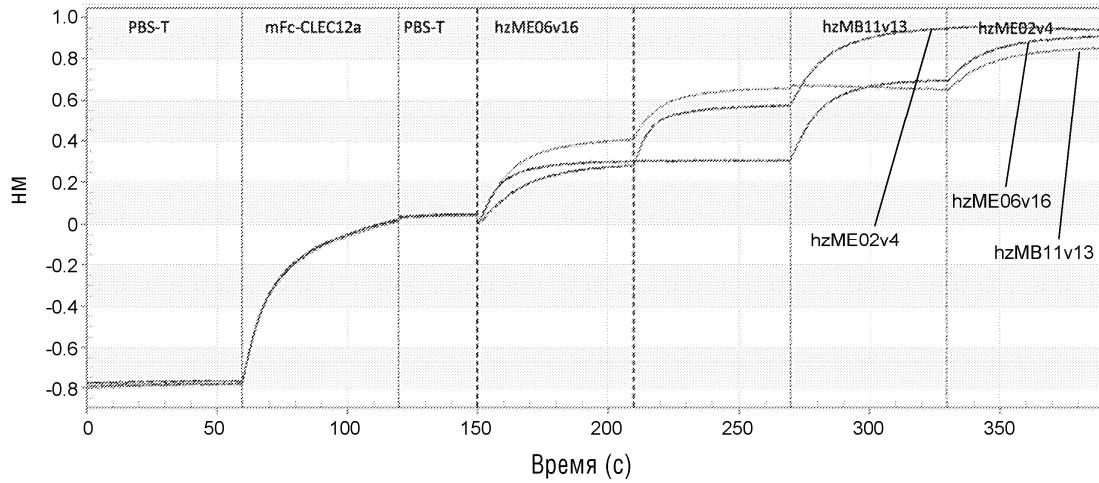
40. Способ по п.39, где дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковое средство.

41. Способ по п.40, где противораковое средство выбирают из химиотерапевтического средства, противоракового биологического средства, лучевой терапии, CAR-T-клеточной терапии и онколитического вируса.

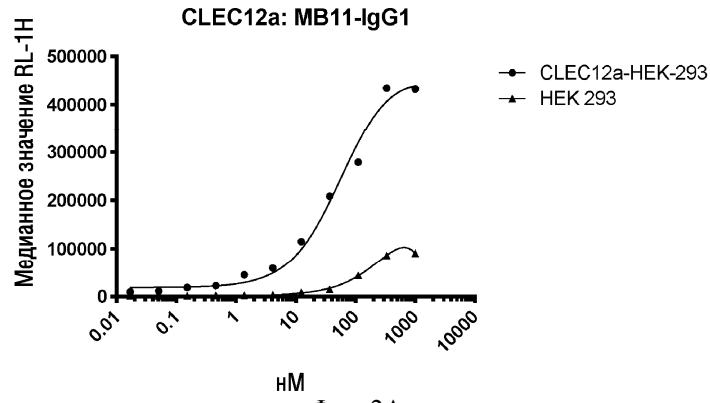
42. Способ по любому из пп.36-41, где рак представляет собой CLEC12a-экспрессирующий рак.



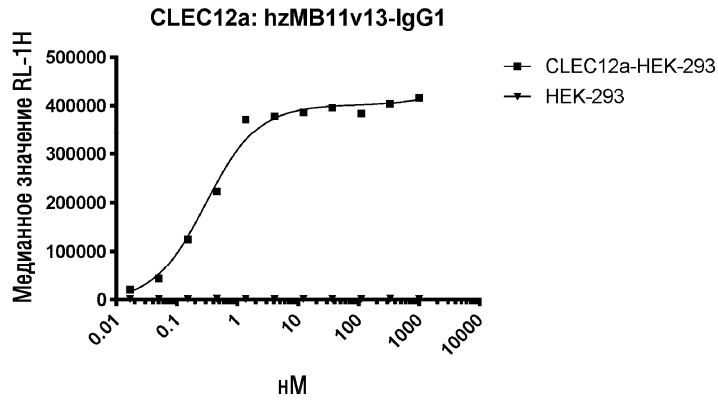
Фиг. 1А



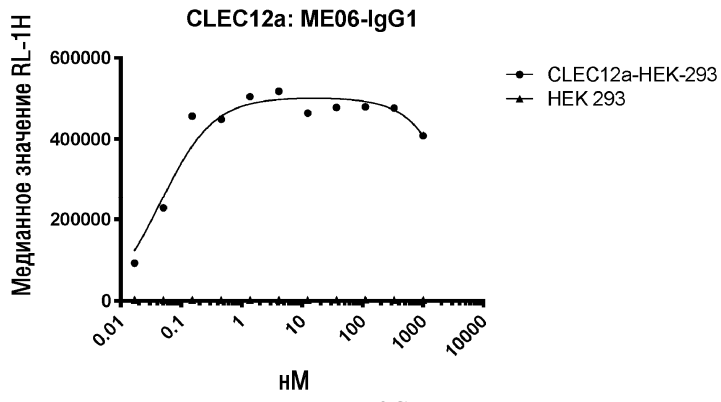
Фиг. 1В



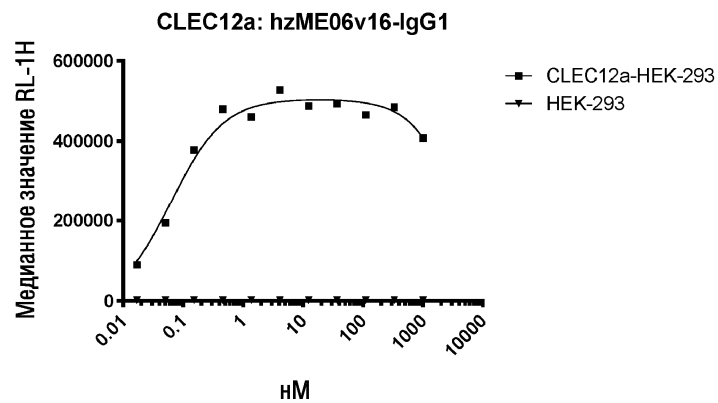
Фиг. 2А



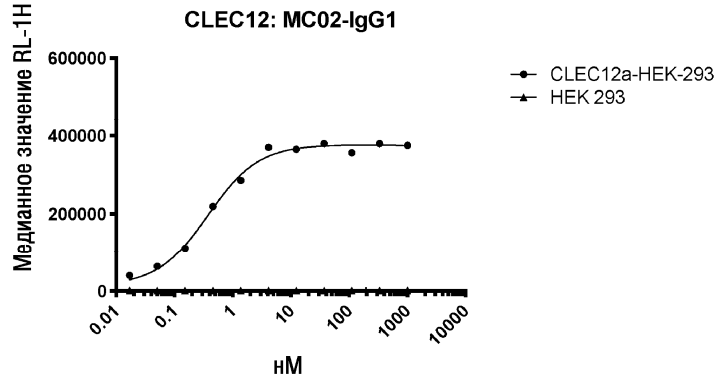
Фиг. 2В



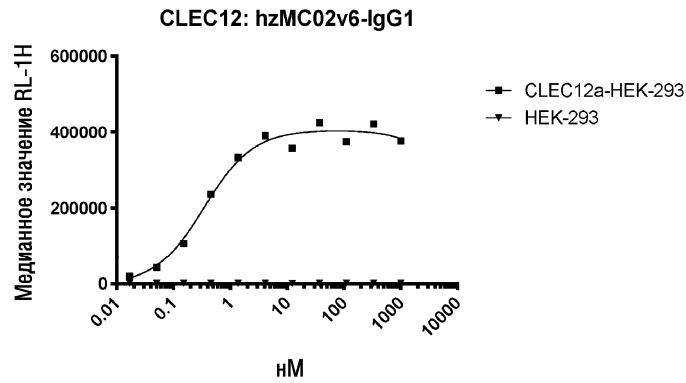
Фиг. 2С



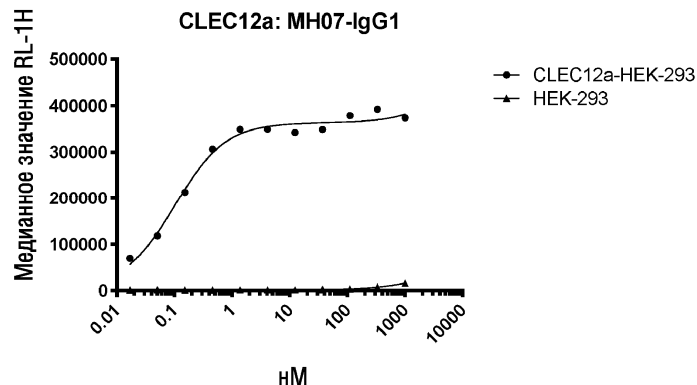
Фиг. 2D



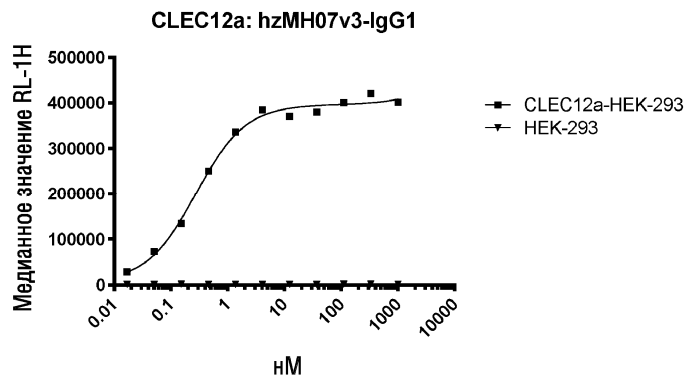
Фиг. 2E



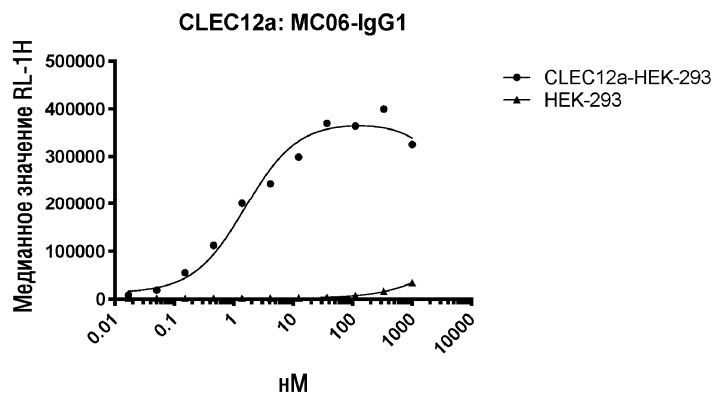
Фиг. 2F



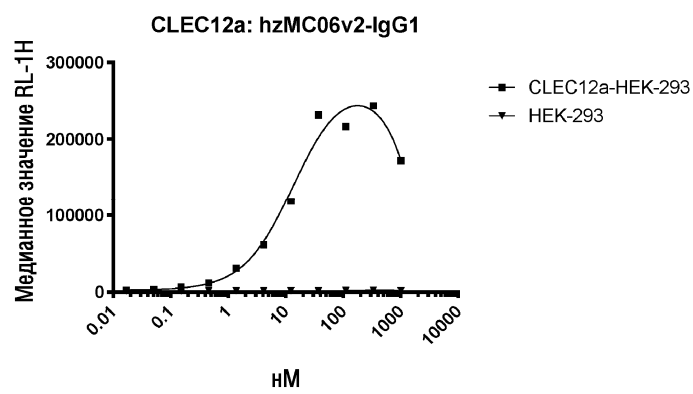
Фиг. 2G



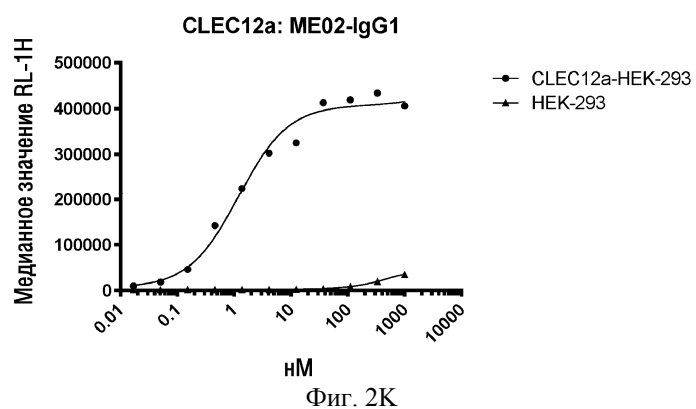
Фиг. 2H



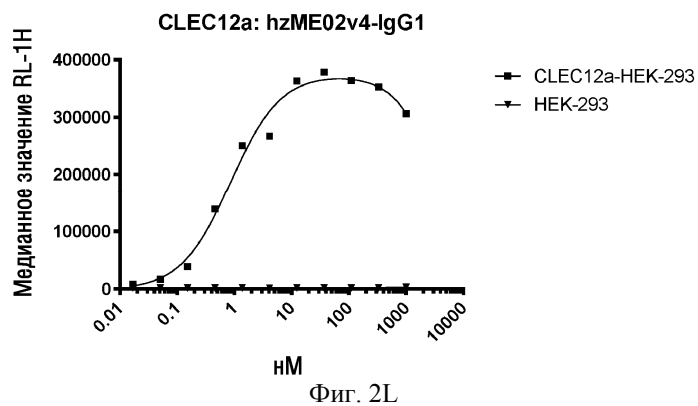
Фиг. 2I



Фиг. 2J



Фиг. 2K



Фиг. 2L

