

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990787 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.11.02

(54) БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К ВСМА И CD3 И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ В
ЛЕЧЕНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

(31) 16196874.8

(32) 2016.11.02

(33) EP

(86) PCT/EP2017/078109

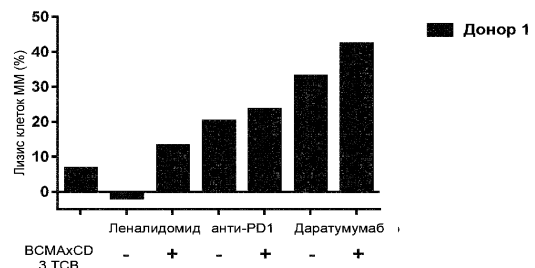
(87) WO 2018/083204 2018.05.11

(71) Заявитель:
ЭНГМАБ САЛ (CH)

(72) Изобретатель:
Бу Минх Дием (CH), Штрейн Клаус
(DE), Пайва Бруно Дэвид Лоуренсо,
Сан Мигель Изкуэдро Хесус Фернандл
(ES)

(74) Представитель:
Глухарёва А.О., Угрюмов В.М. (RU)

(57) Изобретение относится к биспецифичному антителу, специфически связывающемуся с В-клеточным антигеном созревания (ВСМА) человека и с CD3ε человека (CD3) совместно с иммуно-терапевтическим лекарственным средством, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы.



201990787

A1

A1

201990787

БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К ВСМА И CD3, И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Данное изобретение относится к биспецифичному антителу, специфически связывающемуся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3) совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В-клеточный антиген созревания человека, также известный как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, который преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках (Laabi et al. 1992; Madry et al. 1998). BCMA является негликозилированным трансмембранным белком типа III, который участвует в созревании, росте и выживании В-лимфоцитов. BCMA является рецептором двух лигандов суперсемейства ФНО: APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию), лиганда с высоким сродством к BCMA, и фактора активации В-лимфоцитов BAFF, лиганда с низким сродством к BCMA (THANK, BlyS, стимулятор В-лимфоцитов, TALL-1 и zTNF4). APRIL и BAFF демонстрируют структурное сходство и перекрывающуюся, но различную специфичность связывания с рецептором. Отрицательный регулятор TACI также связывается как с BAFF, так и с APRIL. Координированное связывание APRIL и BAFF с BCMA и/или TACI активирует фактор транскрипции NF-κB, и усиливает экспрессию способствующих выживанию членов семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) и отрицательную регуляцию способствующих апоптозу факторов (например, Bid, Bad, Bik, Bim и т. д.), таким образом ингибируя апоптоз и способствуя выживанию. Данное комбинированное действие способствует дифференциации В-лимфоцитов, пролиферации, выживанию и выработке антител (как описано в Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133).

Описаны антитела к BCMA, например, в Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, WO200124812, WO2010104949 и WO2012163805. Упомянутые антитела к BCMA и их применение для лечения лимфом и множественной миеломы, например, в WO2002066516 и WO2010104949. WO2013154760 и WO2015052538 относятся к химерным антигенным рецепторам

(CAR), содержащим фрагмент распознавания BCMA и фрагмент активации Т-лимфоцитов. Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018 относятся к анти-BCMA антителам с активностью блокирования лигандов, которые могут способствовать цитотоксичности клеточных линий множественной миеломы (MM), в виде не конъюгированных антител или в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство. Райан показал, что SG1, ингибирующее BCMA антитело, блокирует APRIL-зависимую активацию ядерного фактора κВ дозозависимым образом *in vitro*. Райан также упомянул антитело SG2, которое незначительно ингибировало связывание APRIL с BCMA.

Не так давно было разработано большое разнообразие форм рекомбинантных биспецифичных антител, например путем слияния, например, форма антитела IgG и одноцепочечные домены (смотрите, например, Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16). Биспецифичные антитела, в которых вариабельные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменены друг на друга, описаны в WO2009080251 и WO2009080252.

Подход, позволяющий обойти проблему ошибочно спаренных побочных продуктов, который известен как «выступы в отверстия», направлен на то, чтобы вызвать спаривание двух различных тяжелых цепей антител путем внесения мутаций в домены CH3 для модификации интерфейса контакта. На одной цепи громоздкие аминокислоты замещают аминокислотами с короткими боковыми цепями, чтобы создать «отверстие». И наоборот, аминокислоты с большими боковыми цепями вносят в другой домен CH3, чтобы создать «выступ». Благодаря совместной экспрессии таких двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, которые должны подходить к обеим тяжелым цепям), наблюдают большее количество гетеродимерной конструкции («выступ-отверстие») в сравнении с гомодимерными конструкциями («отверстие-отверстие» или «выступ-выступ») (Ridgway JB, Presta LG, Carter P. Protein Eng. 9, 617–621 (1996); и WO1996027011). Процент гетеродимера может быть дополнительно увеличен путем ремоделирования поверхностей взаимодействия двух доменов CH3 с использованием подхода фагового дисплея и введения дисульфидного мостика для стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol. Biol 270 (1997) 26-35). Новые подходы в

технологии «выступы в отверстия» описаны, например, в EP 1870459A1. Хотя такой формат кажется очень привлекательным, в настоящее время нет данных, описывающих прогресс в направлении применения в лечебной практике. Одно из важных ограничений такой стратегии представляет собой то, что легкие цепи двух исходных антител должны быть идентичными, чтобы предотвратить образование неправильных пар и формирование неактивных молекул. Таким образом, данный метод не подходит для простой разработки рекомбинантных, биспецифичных антител к двум мишеням, начиная с двух антител к первой и второй мишеней, поскольку должны быть оптимизированы тяжелые цепи таких антител и/или идентичные легкие цепи. Xie, Z., et al, J Immunol. Methods 286 (2005) 95-101 относится к форме биспецифичного антитела с применением scFv в сочетании с технологией «выступы в отверстия» для части FC.

Комплекс TCR/CD3 Т-лимфоцитов состоит из альфа (α)/бета (β) TCR или гамма (γ)/дельта (δ) TCR гетеродимера, совместно экспрессирующегося на поверхности клетки с инвариантными субъединицами CD3, обозначенными гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), зета (ζ), и эта (η). Человеческий CD3 ϵ описан как UniProt P07766 (CD3E_HUMAN).

Анти-CD3 ϵ антитело, описанное в данной области техники, представляет собой SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 взаимодействует как с CD3 приматов, так и человека. SP34 доступен от Pharmingen. Другим анти-CD3 антителом, описанным в данной области техники, является UCHT-1 (смотрите WO2000041474). Другим анти-CD3 антителом, описанным в данной области техники, является BC-3 (Исследовательский институт рака Фреда Хатчинсона; используется в фазах I/II испытаний GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 отличается от UCHT-1 и BC-3 тем, что SP-34 распознает эпитоп, присутствующий только на ϵ -цепи CD3 (смотрите Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047), тогда как UCHT-1 и BC-3 распознают эпитоп, формирующийся как ϵ , так и γ цепями. Дополнительные анти-CD3 антитела описаны в WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837, WO2010037838 и US8236308 (WO2007042261). Последовательности CDR, VH и VL дополнительного анти-CD3 антитела показаны в SEQ ID NO:7 и 8.

Биспецифичные антитела к CD3 и BCMA упоминаются в WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058 и WO2012143498. Соединения CAR антител к BCMA упоминаются в WO 2013154760, WO2013154760 и WO2014140248.

Клеточно-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител (такие как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)) могут быть улучшены путем конструирования их олигосахаридных вариантов по Asn297, как описано в Umaña, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; и US6602684. WO1999054342, WO2004065540, WO2007031875, и WO2007039818, Hristodorov D, Fischer R, Linden L., *Mol Biotechnol.* 2012 Oct 25. (Epub) также относятся к гликозилирующему конструированию антител для усиления Fc-опосредованной клеточной цитотоксичности.

Также несколько аминокислотных остатков в шарнирной области и домене CH2 влияют на клеточно-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител. (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]. Следовательно, модификация таких аминокислот может усиливать клеточно-опосредованные эффекторные функции. Такие модификации антител для усиления клеточно-опосредованных эффекторных функций упомянуты в EP1931709, WO200042072, и включают в себя замены в Fc-части в аминокислотных позициях 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 и 332. Дополнительные модификации антител для усиления клеточно-опосредованных эффекторных функций упомянуты в EP1697415, и включают в себя аминокислотную замену по аминокислотным позициям 277, 289, 306, 344 или 378 согласно ЕС, на заряженную аминокислоту, полярную аминокислоту или неполярную аминокислоту.

Формы антител, и формы биспецифичных и мультиспецифичных антител также представляют собой пептела (WO200244215), Новый Рецептор Антигена («NAR») (WO2003014161), димеры диатело-диатело «TandAbs» (WO2003048209), модифицированный полиалкиленоксидом scFv (US7150872), гуманизированные антитела кролика (WO2005016950), домены синтетического иммуноглобулина (WO2006072620), ковалентные диатела (WO2006113665), флекситела (WO2003025018), доменные антитела, dAb (WO2004058822), вакцитела (WO2004076489), антитела с каркасом приматов Нового Света (WO2007019620),

конъюгат антитело-лекарственное средство с расщепляемыми линкерами (WO2009117531), антитела IgG4 с удаленной областью шарнира (WO2010063785), биспецифичные антитела с IgG4-подобными доменами CH3 (WO2008119353), антитела верблюдовых (US6838254), нанотела (US7655759), диатела CAT (US5837242), биспецифичные (scFv)₂ направленные против антигена-мишени и CD3 (US7235641), slgA плантитела (US6303341), минитела (US5837821), IgNAR (US2009148438), антитела с модифицированной шарнирной и Fc областями (US2008227958, US20080181890), трифункциональные антитела (US5273743), тритела (US6551592), тройтела (US6294654).

В WO2014122143 раскрыты антитела к BCMA человека, характеризующиеся тем, что связывание указанного антитела не снижается 100 нг/мл APRIL больше чем на 20%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 405 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим BCMA без APRIL, указанное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только APRIL, и указанное антитело не изменяет активацию NF-κB без APRIL больше чем на 20% по сравнению с случаем без указанного антитела. В WO2014122144 раскрыты биспецифичные антитела, специфически связывающиеся с двумя мишенями - CD3ε человека и BCMA человека, включающие в себя антитела к человеческому BCMA из WO2014122143. Анти-человеческий BCMA антитело с уникальными свойствами, особенно в отношении его терапевтического применения в качестве биспецифичного связывателя Т-лимфоцитов, представляет собой антитело 83A10, характеризующееся тем, что содержит в качестве областей CDR CDR1H SEQ ID NO:15, CDR2H SEQ ID NO:16, CDR3H SEQ ID NO:17, CDR1L SEQ ID NO:18, CDR3L SEQ ID NO:19 и CDR3L SEQ ID NO:20, также раскрытые в WO2014122143 и WO2014122144.

Соединения талидомида представляют собой 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-дион и его, производные, подобные леналидомиду, помалидомиду, CC122 (регистрационный номер CAS 1398053-45-6) ил CC-220 (регистрационный номер CAS 1323403-33-3). Использование талидомидов для лечения множественной миеломы описано в Hideshima T. et al., Blood 96 (2000), 2943-2950.

Анти-CD38 антитела представляют собой, например, даратумумаб (US20150246123), изатаксимаб (US8877899), MOR202 (WO 2012041800), и AB19 и AB79 (US8362211). Анти-CD38 антитела также упоминаются в WO2006099875, WO2011154453, WO2014068114 и WO2007042309. Применение анти-CD38 моноклонального антитела в лечении множественной миеломы, например, обсуждено Lokhorst HM; N Engl J Med (2015) 373 1207-19.

Анти-PD-1 антитела представляют собой, например, пембролизумаб (Keytruda®, MK-3475), ниволумаб, пидилизумаб, ламбролизумаб, MEDI-0680, PDR001 и REGN2810. Анти-PD-1 антитела описаны, например, в WO200815671, WO2013173223, WO2015026634, US7521051, US8008449, US8354509, WO2009114335, WO2015026634, WO2008156712, WO2015026634, WO2003099196, WO2009101611, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2008/156712, и WO2008/156712.

Анти-PD-L1 антитела представляют собой, например, атезолизумаб, MDX-1105, дурвалумаб и авелумаб. Анти-PD-L1 антитела описаны, например, в WO2015026634, WO2013/019906, WO2010077634, US8383796, WO2010077634, WO2007005874, и WO2016007235.

В WO2012066058 в общих чертах упоминается биспецифичный агент к BCMA и CD3 также в комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов. Многие такие агенты перечислены и среди других упоминаются также производные талидомида, такие как леналидомид. В WO2012143498 также в общих чертах упоминается терапия анти-BCMA антителом для применения в лечении или устранении множественной миеломы, и терапия анти-CD20 антителом и/или анти-CD38 антителом и/или анти-CS1 антителом. В WO2016087531 раскрывается применение биспецифичного антитела к BCMA и CD3 вместе с пролиферативной терапией Т-лимфоцитов, относящейся к терапевтическому лечению или биологическому лечению, которое вызывает пролиферацию или размножение Т-лимфоцитов, например, ингибиторами контрольной точки (например, анти-PD-1, анти-PD-L1). WO2016014565 относится к химерному рецептору антигена (CAR), специфичному к BCMA, и в общих чертах к антителу или фрагменту антитела, что связывается с PD-1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4.

Биспецифичные антитела и соответствующие анти-BCMA антитела согласно данному изобретению раскрыты в EP15179549.9 и PCT/EP2016/068549, сейчас ожидающие рассмотрения, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение включает в себя биспецифичное антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления

а) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-антитела и анти-PD-L1-антитела, для совместного применения в лечении множественной миеломы,

характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления способ лечения множественной миеломы, характеризующийся введением пациенту, нуждающемуся в таком лечении

а) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека

(BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

b) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления терапевтическую комбинацию для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, характеризующуюся тем, что содержит

a) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления изделие, характеризующееся тем, что оно содержит

- а) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы
 - i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
 - ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
 - iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28 в фармацевтически приемлемом носителе,
- б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,
- в) фармацевтически приемлемый носитель и инструкции для введения указанного биспецифичного антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления способ изготовления лекарственного средства, характеризующийся использованием

- а) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H

SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,

b) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

c) объединяя указанное биспецифичное антитело и указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство в фармацевтически приемлемом носителе.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Биспецифичные антитела и иммунотерапевтические лекарственные средства, описанные в данном документе, предназначены для использования

a) в комбинированном применении в лечении множественной миеломы согласно изобретению,

b) в способе лечения множественной миеломы согласно изобретению,

c) в терапевтической комбинации для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, согласно изобретению,

d) в изделии согласно изобретению, и

e) в способе изготовления лекарственного средства согласно изобретению.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-CD38 антитело, выбранное из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба (SAR650984), MOR202, Ab79 (Takeda) и Ab19 (Takeda).

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой соединение талидомида, выбранное из группы, состоящей из талидомида, леналидомида, CC-122, CC-220 и помалидомида.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из группы, состоящей из пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16 и h409A17.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из группы, состоящей из авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба и MDX-1105.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой леналидомид, и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- a) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- b) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой CC-122 или CC-220, и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- a) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- b) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

а) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

б) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой пембролизумаб и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

а) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

б) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой леналидомид, и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:13, или область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой CC-122 или CC-220, и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:13, или область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:13, или область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой пембролизумаб, и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:13, или область VH SEQ ID NO:10 и область VL SEQ ID NO:14.

Первая связывающая часть согласно данному изобретению содержит в качестве областей CDR3H и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10 (по антителу 83A10 смотрите Таблицу 1А и В далее в тексте).

Первая связывающая часть согласно данному изобретению содержит, в одном варианте осуществления, в качестве областей CDR3H и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10, но демонстрирует особенно действенные и целесообразные преимущества по сравнению с антителом 83A10, для уничтожения клеток MM в аспиратах костного мозга пациента.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO:17 и область CDR3L SEQ ID NO:20, и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- а) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- б) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26,
- в) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,
- г) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32,
- д) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32, и
- е) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- а) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- б) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

с) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления, аминокислота 49 представляет собой E в SEQ ID NO:12, S в SEQ ID NO: 13 или H в SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14, причем аминокислота 74 представляет собой треонин (T) или аланин (A). В одном варианте осуществления, аминокислота 74 представляет собой A в SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть содержит в качестве областей CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10. Изобретение включает в себя моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO:31, область CDR2L SEQ ID NO:32 и область CDR3L SEQ ID NO:20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- а) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30,
- б) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, или
- с) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL SEQ ID NO:12 и область VH, выбранную из группы, что состоит из областей VH SEQ ID NO:38, 39 и 40. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL SEQ ID NO:12, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления, аминокислота 49 представляет собой E.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть

характеризуется тем, что содержит в качестве области VL область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:38, 39 и 40. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:38, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:39, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:40, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть дополнительно характеризуется тем, что она также специфически связывается с BCMA яванского макака. В одном варианте осуществления, антитело согласно данному изобретению демонстрирует в отношении связывания с BCMA различие в аффинности для яванского макака/человека в интервале от 1,5 до 5, или от 1,5 до 10, или от 1,5 до 16 (таблица 5).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что оно также специфически связывается с CD3 яванского макака. В одном варианте осуществления, биспецифичное анти-BCMA/анти-CD3 антитело демонстрирует различие для яванского макака/человека для Mab CD3, в интервале от 1,25 до 5, или от 0,8 до 1,0.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть представляет собой антитело с частью Fc или без части Fc, включая мультиспецифическое антитело, биспецифичное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), такой как вовлекающий биспецифичный активатор Т-лимфоцитов, диатело, или тандемный scFv, миметик антитела, такой как DARPIn, не конъюгированное моноспецифическое антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело, биспецифичное антитело, вовлекающий биспецифичный активатор Т-лимфоцитов, диатело или тандемный scFv специфически связывается с BCMA и CD3.

На основе первой связывающей части можно создавать конъюгаты антитело-лекарственное средство к BCMA, и мультиспецифические или биспецифичные антитела к BCMA и CD3 в различных формах, с или без части Fc, известной в данной области техники (смотрите, например, выше «уровень техники»), одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), такие как вовлекающие биспецифичные активаторы Т-лимфоцитов, диатела, тандемные scFv, и миметики антител, такие как DARPins, все они также являются вариантами осуществления изобретения. Формы биспецифичных антител хорошо известны в данной области техники и, например, также описаны в Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126-1136, и Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010), и Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве VH BCMA область VH SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что VL BCMA выбирают из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH BCMA область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH BCMA область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что

содержит в качестве области VH BCMA область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления, аминокислота 49 представляет собой E (SEQ ID NO:12), S (SEQ ID NO:13) или H (SEQ ID NO:14). В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14, причем аминокислота 74 представляет собой треонин (T) или аланин (A). В одном варианте осуществления, аминокислота 74 представляет собой A в SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит VH BCMA, содержащую область CDR3H SEQ ID NO:17, и VL BCMA, содержащую область CDR1L SEQ ID NO:31, область CDR2L SEQ ID NO:32 и область CDR3L SEQ ID NO:20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- a) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30,
- b) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, или
- c) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37.

Биспецифичное антитело к BCMA и CD3 характеризуется в одном варианте осуществления тем, что содержит

- a) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с одной из указанных мишеней: CD3 и BCMA; и
- b) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с другой из указанных мишеней, причем переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 заменены друг другом.

В одном варианте осуществления, домен VH указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела. В одном варианте осуществления, домен VL указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит не больше чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab части анти-BCMA антитела, и не больше чем одну часть Fc, в одном варианте осуществления части Fc человека. В одном варианте осуществления, не больше чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела, и не больше чем один фрагмент Fab части анти-BCMA антитела соединяют с частью Fc, и соединение осуществляют посредством С-концевого связывания фрагмента(тов) Fab с шарнирной областью. В одном варианте осуществления, второй фрагмент Fab части анти-BCMA антитела соединяют через его С-конец либо с N-концом фрагмента Fab части анти-CD3 антитела, либо с шарнирной областью части Fc и, следовательно, между частью Fc и частью анти-CD3 антитела. Предпочтительные биспецифичные антитела показаны на Фиг. 1-3.

Особенно предпочтительными являются биспецифичные антитела, содержащие только фрагменты Fab и часть Fc, как указано, с или без «аминокислотной замены»:

Fab BCMA-Fc-Fab CD3 (биспецифичная форма, Фиг. 1A или 1B),

Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA (биспецифичная форма, Фиг. 2A или 2B),

Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (биспецифичная форма, Фиг. 2C или 2D),

Fc-Fab CD3-Fab BCMA (биспецифичная форма, Фиг. 3A или 3B),

Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (биспецифичная форма, Фиг. 3C или 3D).

Как показано на Фиг. 1-3, «Fab BCMA-Fc», «Fab BCMA-Fc-Fab CD3» и «Fab BCMA-Fc-Fab CD3» означает, что фрагмент(ы) Fab соединен(соединяют) через его(их) С-конец с N-концом фрагмента Fc. «Fab CD3-Fab BCMA» означает, что фрагмент Fab CD3 соединяют его N-концом с С-концом фрагмента Fab BCMA. «Fab BCMA - Fab CD3» означает, что фрагмент Fab BCMA соединяют его N-концом с С-концом фрагмента Fab CD3.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит второй фрагмент Fab указанного анти-BCMA антитела, соединенного его С-концом с N-концом части антитела к CD3 указанного биспецифичного антитела. В одном варианте осуществления, домен VL указанной первой части анти-CD3 антитела соединяют с доменом CH1 или CL указанного второго анти-BCMA антитела.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит второй фрагмент Fab указанного анти-BCMA антитела, соединенный его С-концом с частью

Fc (подобно первому фрагменту Fab указанного анти-BCMA антитела) и соединенный его N-концом с C-концом части антитела к CD3. В одном варианте осуществления, домен CH1 указанной части анти-CD3 антитела соединяют с доменом VH указанной второй части анти-BCMA антитела.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит часть Fc, соединенную ее N-концом с C-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3. В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит часть Fc, соединенную ее первым N-концом с C-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3, и второй фрагмент Fab указанного анти-BCMA антитела, соединенный его C-концом с вторым N-концом части Fc. В одном варианте осуществления, домен CL фрагмента Fab антитела к CD3 соединен с шарнирной областью части Fc. В одном варианте осуществления, домен CH1 фрагмента Fab антитела к BCMA соединен с шарнирной областью части Fc.

Фрагменты Fab соединены друг с другом с помощью подходящего линкера в соответствии с уровнем техники. В одном варианте осуществления, используется линкер (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Поскольку линкер представляет собой пептидный линкер, такое ковалентное соединение обычно осуществляют биохимическим рекомбинантным способом, используя нуклеиновую кислоту, кодирующую домены VL и/или VH соответствующих фрагментов Fab, линкер и, если необходимо, цепь части Fc.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело к BCMA и CD3 характеризуется тем, что переменный домен VH части анти-CD3 антитела (далее называемый «VH CD3») содержит CDR тяжелой цепи - SEQ ID NO:1, 2 и 3 в виде соответствующих CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи, и переменный домен VL части анти-CD3 антитела (далее называемый «VL CD3») содержит CDR легкой цепи - SEQ ID NO:4, 5 и 6 в виде соответствующих CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что переменные домены части анти-CD3ε-антитела представляют собой SEQ ID NO:7 и 8.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что часть анти-CD3 антитела (вторая связывающая часть биспецифичного антитела) соединяют ее N-концом с C-концом части анти-BCMA антитела (первая связывающая часть биспецифичного антитела), и переменные домены VL и VH части анти-CD3 антитела или константные домены CL и CH1 заменяют друг другом.

В одном варианте осуществления, домен VH указанной части анти-CD3 антитела соединяют с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела. В одном варианте осуществления, домен VL указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела.

Такая часть антитела в одном варианте осуществления представляет собой фрагмент Fab соответствующего антитела.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело, в котором переменные домены VL и VH в легкой цепи и соответствующей тяжелой цепи части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела заменяют друг другом, характеризуется тем, что содержит константный домен CL части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела, при этом аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и в соответствующем константном домене CH1 аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D). В одном варианте осуществления, антитело является одновалентным для связывания CD3. В одном варианте осуществления, в дополнение к аминокислотной замене в позиции 124 в константном домене CL, аминокислоту в позиции 123 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (далее называемая «вариантом по заряду»). В одном варианте осуществления, антитело является моновалентным для связывания CD3, и аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело дополнительно содержит ту же анти-BCMA связывающую часть в еще одном экземпляре (в одном варианте осуществления фрагмент Fab). Это также означает, что если первая анти-BCMA связывающая часть содержит вариант по заряду, то

вторая анти-BCMA связывающая часть содержит тот же вариант по заряду. (Все порядковые номера аминокислот представлены согласно Кабату).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что содержит

- a) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с BCMA; и
- b) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и
- c) причем в константном домене CL первой легкой цепи a) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 первой тяжелой цепи a) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, Фиг. 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

В одном варианте осуществления, указанное биспецифичное антитело, описанное в последнем предыдущем абзаце, дополнительно характеризуется тем, что указанное биспецифичное антитело дополнительно содержит фрагмент Fab указанного первого антитела (далее называемый также «BCMA-Fab») и в константном домене CL указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 124 замещают независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, Фиг. 2A, 2C).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что содержит

- a) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с BCMA; и
- b) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH в

второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и при этом

с) в константном домене CL второй легкой цепи b) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 второй тяжелой цепи b) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата).

В одном варианте осуществления, в дополнение к аминокислотной замене в позиции 124 в константном домене CL первой и второй легкой цепи, аминокислоту в позиции 123 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H).

В одном варианте осуществления, в константном домене CL аминокислоту в позиции 124 замещают лизином (K), в константном домене CH1 аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают глутаминовой кислотой (E). В одном варианте осуществления, дополнительно в константном домене CL аминокислота в позиции 123 замещают аргинином (R).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из одного фрагмента Fab антитела, специфически связывающегося с CD3 (далее называемого также «CD3-Fab»), и одного фрагмента Fab анти-BCMA антитела (далее называемого также «BCMA-Fab»), и части Fc, причем CD3-Fab и BCMA-Fab соединены их C-концами с шарнирной областью указанной части Fc. Либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит замену, и CD3-Fab содержит кроссовер (Фиг. 1A и 1B).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из одного CD3-Fab и одного BCMA-Fab и части Fc, причем CD3-Fab и BCMA-Fab соединяют их C-концами с шарнирной областью указанной части Fc, и второго BCMA-Fab, который соединяют его C-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (Фиг. 2A и 2B). Особенно предпочтительным является биспецифичное антитело, содержащее BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, причем оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену, а CD3-Fab содержит кроссовер VL/VH (Фиг. 2A). Особенно предпочтительным является биспецифичное антитело, состоящее из BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, причем оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену Q124K, E123R, K147E и K213E, а CD3-Fab содержит

кроссOVER VL/VH. Особенно предпочтительным является то, что оба BCMA-Fab содержат в качестве CDR CDR антитела 21, 22 или 42, или в качестве VH/VL VH/VL антитела 21, 22 или 42 (антитела 21, 22 и 42 смотрите Таблицу 1А и В далее в тексте).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из двух BCMA-Fab и части Fc, причем один BCMA-Fab и CD3-Fab соединены их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc, и второй BCMA-Fab соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (Фиг. 2А и 2В).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из двух BCMA-Fab и части Fc, причем BCMA-Fab соединены их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc и CD3-Fab, который соединен его С-концом с N-концом одного BCMA-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (Фиг. 2С и 2D).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из одного CD3-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и BCMA-Fab, который соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (Фиг. 1А и 1В).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из одного CD3-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и BCMA-Fab, который соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (Фиг. 3А и 3В).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело состоит из одного BCMA-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и CD3-Fab, который соединен его С-концом с N-концом BCMA-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (Фиг. 3С и 3D).

Фрагменты Fab химически соединены друг с другом с использованием подходящего линкера согласно уровню техники. В одном варианте осуществления, используется линкер (Gly4-Ser1)3 (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack

M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Соединение двух фрагментов Fab осуществляют между тяжелыми цепями. Следовательно, С-конец CH1 первого фрагмента Fab соединен с N-концом VH второго фрагмента Fab (без кроссовера) или с VL (кроссовер). Соединение фрагмента Fab и части Fc осуществляют в виде соединения CH1 и CH2.

Первый и второй фрагмент Fab антитела, специфически связывающегося с BCMA, в одном варианте осуществления, получены из одного и того же антитела, и в одном варианте осуществления идентичны по последовательностям CDR, последовательностям переменного домена VH и VL и/или последовательностям константного домена CH1 и CL. В одном варианте осуществления, аминокислотные последовательности первого и второго фрагмента Fab антитела, специфически связывающегося с BCMA, являются идентичными. В одном варианте осуществления, антитело к BCMA представляет собой антитело, содержащее последовательности CDR антитела 21, 22 или 42, антитело, содержащее последовательности VH и VL антитела 21, 22 или 42, или антитело, содержащее последовательности VH, VL, CH1, и CL антитела 21, 22 или 42.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит в качестве фрагментов Fab и части Fc не больше чем один фрагмент Fab анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab анти-BCMA антитела, и не больше чем одну часть Fc, в одном варианте осуществления часть Fc человека. В одном варианте осуществления, второй фрагмент Fab анти-BCMA антитела соединен его С-концом либо с N-концом фрагмента Fab анти-CD3 антитела, либо с шарнирной областью части Fc. В одном варианте осуществления, соединение выполняют между CH1 BCMA-Fab и VL CD3-Fab (кроссовер VL/VH).

В одном варианте осуществления, часть антитела, специфически связывающаяся с CD3 человека, в одном варианте осуществления фрагмента Fab, характеризуется тем, что содержит переменный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO:1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO:4, 5 и 6 легкой цепи, в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи анти-CD3ε антитела (CDR MAB CD3). В одном варианте осуществления, часть антитела, специфически

связывающаяся с CD3 человека, характеризуется тем, что переменные домены имеют SEQ ID NO:7 и 8 (VHVL MAB CD3).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело специфически связывается с внеклеточным доменом BCMA человека и с CD3ε человека, характеризуется тем, что содержит набор тяжелой и легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из полипептидов

- i) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, и SEQ ID NO:51(2x); (набор 1 TCB антитела 21),
- ii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, и SEQ ID NO:54 (2x) (набор 2 TCB антитела 22), и
- iii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, и SEQ ID NO:57(2x) (набор 3 TCB антитела 42).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что домен CH3 одной тяжелой цепи и домен CH3 другой тяжелой цепи пересекаются в интерфейсе, который содержит исходный интерфейс между доменами CH3 антитела; причем указанный интерфейс изменяют, чтобы способствовать формированию биспецифичного антитела, при этом изменение характеризуется тем, что:

- a) домен CH3 одной тяжелой цепи изменяют так, что в пределах исходного интерфейса домен CH3 одной тяжелой цепи, который пересекается с исходным интерфейсом домена CH3 другой тяжелой цепи в биспецифичном антителе, аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, в результате чего образуется выпуклость в пределах интерфейса домена CH3 одной тяжелой цепи, которая позиционируется в углублении в пределах интерфейса домена CH3 другой тяжелой цепи, и
- b) домен CH3 другой тяжелой цепи изменяют так, что в пределах исходного интерфейса второго домена CH3, который пересекается с исходным интерфейсом первого домена CH3 в биспецифичном антителе, аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, в результате чего образуется углубление в пределах интерфейса второго домена CH3, в пределах которого позиционируется выпуклость в интерфейсе первого домена CH3.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T), валина (V).

В одном варианте осуществления, такое биспецифичное антитело характеризуется тем, что оба домена CH3 дополнительно изменяют путем внесения цистеина (C) в виде аминокислоты в соответствующие позиции каждого домена CH3.

В одном варианте осуществления, такое биспецифичное антитело характеризуется тем, что один из константных доменов CH3 тяжелой цепи обеих тяжелых цепей заменяют константным доменом CH1 тяжелой цепи; и другой константный домен CH3 тяжелой цепи заменяют константным доменом CL легкой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело содержит модифицированную часть Fc, индуцирующую клеточную гибель 20% или большего количества клеток, препарата клеток, экспрессирующих BCMA, через 24 часа, при концентрации указанного антитела 100 нМ по АЗКЦ относительно контроля в идентичных условиях с использованием того же антитела с исходной частью Fc в качестве контроля. Такое антитело в одном варианте осуществления представляет собой не конъюгированное антитело.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело представляет собой антитело с количеством фукозы 60% или меньше от общего количества олигосахаридов (сахаров) по Asn297 (смотрите, например, US20120315268).

В одном варианте осуществления, часть Fc содержит аминокислотные замены, которые внесены в часть Fc человека и раскрыты в SEQ ID NO:55 и 56.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является химерный антигенный рецептор (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцита анти-BCMA антитела совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического

производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы. В таком варианте осуществления, анти-BCMA антитело состоит из одноцепочечного домена VH и VL первой связывающей части, и трансмембранного дзета CD3 и эндодомена. Предпочтительно дзета-домен CD3 соединен через спейсер с С-концом указанного домена VL, а N-конец домена VL соединен через спейсер с С-концом указанного домена VH. Химерные антигенные рецепторы антител BCMA, полезные трансмембранные домены и эндодомены, и способы их получения описаны, например, в Ramadoss NS. et al., J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015), Carpenter RO et al., Clin. Cancer. Res. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013), WO2015052538 и WO2013154760.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть представляет собой Mab21, Mab22, Mab42, Mab27, Mab33 и Mab39 (для антител Mab 21, 22, 42, 27, 33, 39 смотрите Таблицы 1А и В далее в тексте), описанные в данном документе в виде их последовательностей CDR и/или последовательностей VH/VL вместе с описанными последовательностями CL и CH1 в качестве антиген-связывающих фрагментов, особенно фрагментов Fab. В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело содержит или не содержит часть Fc, в частности форму 2 + 1, и тяжелая и легкая цепи биспецифичного антитела в частности такие, как описано в Таблице 1А.

Анти-BCMA антитело уменьшает количество, в биспецифичной форме, в частности в форме 2 + 1, злокачественных плазматических клеток человека в аспиратах костного мозга с множественной миеломой (ММ) по меньшей мере на 80% после 48-часовой обработки в концентрации от 10 нМ до 1 фМ включительно. Анти-BCMA антитела были охарактеризованы в пэннинге библиотеки фагового дисплея переменных тяжелой цепи (VH) и переменных легкой цепи (VL) антитела 83A10 (библиотека VH, библиотека VL) с помощью 1-50 нМ BCMA яванского макака за 1-3 раунда, и отборе переменных легкой цепи и переменных тяжелой цепи, которые обладают такими свойствами, как такой биспецифичный связыватель Т-лимфоцитов. Предпочтительно, пэннинг проводят в 3 раунда, используя 50 нМ BCMA яванского макака (суBCMA) для раунда 1, 25 нМ BCMA яванского макака для раунда 2, и 10 нМ BCMA яванского макака для раунда 3. Предпочтительно

библиотеки рандомизированы либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи, либо по CDR1 и CDR2 тяжелой цепи. Предпочтительно идентифицируют легкую и тяжелую цепи, каждая из которых связывается в виде фрагмента Fab, содержащего, кроме того, соответствующий VH или VL антитела 83A10, с ВСМА человека (huBCMA) с КД от 50 пМ до 5 нМ, и с ВСМА яванского макака с КД от 0,1 нМ до 20 нМ. Предпочтительно биспецифичная форма представляет собой форму согласно Фиг. 2А, содержащую соответствующие константные домены VL и VH замещения Fab CD3 друг на друга, и аминокислотные замещения K213E и K147E в домене CH1, и аминокислотные замещения E123R и Q124K в домене CL в обоих вариантах Fab BCMA.

Биспецифичное антитело, упомянутое в данном документе, может быть получено с помощью этапов

- a) трансформации клетки-хозяина с помощью
- b) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанной молекулы антитела,
- c) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и
- d) выделения указанной молекулы антитела из указанной культуры.

Биспецифичное антитело, упомянутое в данном документе, может быть получено с помощью этапов

- e) трансформации клетки-хозяина с помощью
- f) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первой мишенью
- g) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с второй мишенью, причем переменные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменяют друг на друга;
- h) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и
- i) выделения указанной молекулы антитела из указанной культуры.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифичное антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека

(BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, и фармацевтически приемлемый носитель.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифичное антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, для применения в качестве медикамента.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифичное антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из

группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в качестве медикамента в лечении множественной миеломы.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело согласно данному изобретению содержит первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения, что может быть применено для лечения патологий плазматических клеток, таких как множественная миелома (ММ), или других патологий плазматических клеток, экспрессирующих BCMA, как описано ниже. ММ представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток, характеризующееся моноклональным распространением и накоплением аномальных плазматических клеток в костном мозге. ММ также включает в себя циркулирующие клональные плазматические клетки с одинаковой перестройкой гена IgG и соматической гипермутацией. ММ возникает из бессимптомного предракового состояния, называемого моноклональной гаммапатией неизвестной значимости (MGUS), характеризующегося низким уровнем плазматических клеток в костном мозге и моноклонального белка. ММ клетки пролиферируют с низкой скоростью. ММ возникает в результате прогрессирующего возникновения множественных структурных хромосомных изменений (например, несбалансированных транслокаций). ММ включает в себя обоюдное взаимодействие злокачественных плазматических клеток и микроокружения костного мозга (например, нормальных стромальных клеток костного мозга). Клинические признаки активной ММ включают в себя выброс моноклональных антител, переполнение костного мозга плазматическими клетками, литические поражения костей и разрушение костей в результате чрезмерной стимуляции остеокластов (Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Другая патология плазматических клеток с вовлечением плазматических клеток, т.е.

экспрессирующих BCMA, представляет собой системную красную волчанку (СКВ), также известную как волчанка. СКВ - это системное аутоиммунное заболевание, которое может поражать любую часть тела и проявляется в том, что иммунная система атакует собственные клетки и ткани организма, что приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей. Это реакция гиперчувствительности типа III, при которой откладываются комплексы антитело-антиген и вызывают дальнейший иммунный ответ (Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337). Другие патологии плазматических клеток представляют собой плазмноклеточный лейкоз и AL-амилоидоз (смотрите также Примеры 19 и 20). Ожидается, что при всех этих патологиях плазматических клеток будет полезным деплетирование плазматических клеток/злокачественных плазматических клеток антителами согласно данному изобретению для пациентов, страдающих от такого заболевания.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся

часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифичное антитело с усиленной эффекторной функцией, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифичное антитело с уменьшенной эффекторной функцией, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно

первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифичное антитело в качестве диалата, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, вводят один или два раза в неделю в одном варианте осуществления посредством подкожного введения (например, в одном варианте осуществления в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно до 25 мг/м²/неделя, предпочтительно до 250 мг/м²/неделя). Благодаря превосходной цитотоксической активности биспецифичного антитела их можно вводить, по меньшей мере, при той же величине диапазона клинических доз (или даже ниже) по сравнению с обычными моноспецифичными антителами или обычными

биспецифичными антителами, которые не являются биспецифичными по отношению к Т-лимфоцитам (т.е. не связываются с CD3 одним плечом). Предусматривается, что для биспецифичного антитела и иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, предпочтительным является подкожное введение в клинических условиях (например, в диапазоне доз от 0,1 до 250 мг/м²/неделя). Кроме того, для пациентов с высокими уровнями APRIL и BAFF в сыворотке (например, для пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличение дозы биспецифичного антитела, поскольку на него может не влиять конкуренция с лигандом. Напротив, дозы для других лиганд-блокирующих/конкурирующих анти-BCMA антител, возможно, должны быть увеличены для таких пациентов. Другим преимуществом биспецифичного антитела является период полужизни, составляющий примерно от 4 до 12 дней, который делает возможным введение по меньшей мере один или два раза в неделю.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело представляет собой антитело, свойства которого позволяют проводить лечение один/два раза в неделю внутривенным путем, но предпочтительно путем подкожного введения (например, дозировка в диапазоне 200-2000 мг/м²/неделю в течение 4 недель). Предусматривается, что для подкожного введения биспецифичного антитела возможными и предпочтительными являются клинические условия (например, в диапазоне доз 200-2000 мг/м²/неделя, в зависимости от показаний по заболеванию). Кроме того, для пациентов с высоким уровнем APRIL и BAFF в сыворотке (например, для пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличение дозы биспецифичного антитела (например, не блокирующего лиганды/конкурирующего антитела), поскольку конкурентное связывание с лигандом может не влиять на него. Напротив, дозы для других лиганд-блокирующих/конкурирующих анти-BCMA антител для таких пациентов, возможно, должны быть увеличены, что делает подкожное введение технически более сложным (например, фармацевтически). Другое преимущество биспецифичного антитела основано на включении части Fc, которая связана с периодом полужизни от 4 до 12 дней и делает возможным введение по меньшей мере один или два раза в неделю.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Биспецифичные бивалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE). аминокислотные замены RK/EE внесены в CL-CH1, чтобы уменьшить ошибочное спаривание/количество побочных продуктов при продуцировании LC. Fab CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов.

Фиг. 2. Предпочтительные биспецифичные трехвалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). аминокислотные замены RK/EE внесены в CL-CH1 чтобы уменьшить LC ошибочное спаривание/количество побочных продуктов при продуцировании. Предпочтительно Fab CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов. Предпочтительно Fab CD3 и Fab BCMA соединены друг с другом гибкими линкерами.

Фиг. 3. Биспецифичные бивалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано: (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). Предпочтительно, Fabs CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов. Fab CD3 и Fab BCMA соединены друг с другом гибкими линкерами.

Фиг. 4. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток H929 MM, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (BCMAxCD3-TCB), по данным измерения высвобождения ЛДГ (лактатдегидрогеназа). Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток MM H929, индуцированного 21-TCB_{scv} (закрашенный круг), 22-TCB_{scv} (закрашенный треугольник), 42-TCB_{scv} (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-TCB_{scv} (незакрашенный круг, пунктирная линия). Определение термина TCB или TCB_{scv} смотрите выше. TCB_{scv}, используемое в экспериментах, результаты которых показаны на Фиг. с 4 по 16 и с

19 по 21, имело форму, показанную на Фиг. 2А (cv означает аминокислотные замены с вариантом по заряду). Происходило зависимое от концентрации уничтожение клеток H929 для всех биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным ТСВ. Эксперименты проводили с донором 1 (А), донором 3 (В), донором 4 (С), донором 5 (D) МКПК с использованием соотношения эффекторных клеток к опухолевым клеткам-мишеням (Е:Т), составляющего 10 МКПК к 1 ММ клетке (смотрите Пример 8).

Фиг. 5. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток L363 ММ, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным измерения высвобождения ЛДГ. Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток L363 ММ, индуцированного 21-ТСВcv (закрашенный круг), 22-ТСВcv (закрашенный треугольник), 42-ТСВcv (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-ТСВcv (незакрашенный круг, пунктирная линия). Наблюдали зависимое от концентрации уничтожение клеток L363 для всех биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным ТСВ. Эксперименты проводили с донором 1 (А), донором 2 (В), донором 3 (С), донором 4 (D), донором 5 (Е) МКПК с использованием соотношения Е:Т, составляющего 10 МКПК к 1 ММ клетке (смотрите Пример 9).

Фиг. 6. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226 ММ, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным измерения высвобождения ЛДГ. Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток RPMI-8226 ММ, индуцированного 21-ТСВcv (закрашенный круг), 22-ТСВcv (закрашенный треугольник), 42-ТСВcv (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-ТСВcv (незакрашенный круг, пунктирная линия). Наблюдали зависимое от концентрации уничтожение клеток RPMI-8226 для всех биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным ТСВ. Эксперименты проводили с донором 2 (А), донором 3 (В), донором 4 (С), донором 5 (D) МКПК с использованием соотношения Е:Т, составляющего 10 МКПК к 1 ММ клетке (смотрите Пример 10).

Фиг. 7. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток JJN-3 ММ, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным

проточной цитометрии. Зависимое от концентрации уничтожение клеток JJN-3 MM с помощью 22-TCBcv (закрашенный треугольник), 42-TCBcv (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-TCBcv (незакрашенный круг, пунктирная линия). Процент аннексин-V-положительных клеток JJN-3 (A, C) и лизиса опухолевых клеток (B, D) были определены и нанесены на график. Процент лизиса клеток JJN-3, вызванный определенной концентрацией биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела определяли следующим образом: абсолютное количество аннексин-V-негативных клеток JJN-3 при данной концентрации TCB и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-негативных клеток JJN-3 без TCB; деля на абсолютное количество аннексин-V-негативных клеток JJN-3 без TCB. Эксперименты проводили с 2 донорами МКПК: донором 1 (A, B) и донором 2 (C, D) с использованием соотношения Е:Т, составляющего 10 МКПК к 1 клетке MM (смотрите, Пример 11).

Фиг. 8. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным мультипараметрической проточной цитометрии. Процент аннексин-V-положительных миеломных плазматических клеток определяли и наносили на график в зависимости от концентраций TCB. Наблюдали зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали лизис Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-лимфоцитов исходя из 8-цветной мультипараметрической панели. Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным TCB при самой высокой концентрации тестируемых антител TCB. По сравнению с 83A10-TCBcv (A), 42-TCBcv (B) и 22-TCBcv (C) были более эффективными в индукции клеточной гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента (смотрите Пример 13).

Фиг. 9. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированный биспецифичными анти-

BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Процент аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток определяли и наносили на график в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали лизис незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ (данные не показаны). По сравнению с 83A10-ТСВсв, 42-ТСВсв и 22-ТСВсв были более эффективными в индуцировании уничтожения миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, что отражалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (аннексин-V-отрицательных) миеломных плазматических клеток. Репрезентативные эксперименты на пациенте 001 (А) и пациенте 007 (В) (смотрите Пример 13).

Фиг. 10. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Определяли процент миеломных плазматических клеток с отрицательной реакцией на пропидий йодид, и наносили на график процент жизнеспособных плазматических клеток костного мозга относительно контроля в виде питательной среды (МС) в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали (А – G) зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали (Н) лизис микросреды костного мозга (BMME) (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ. По сравнению с 83A10-ТСВсв, 42-ТСВсв и 22-ТСВсв были более эффективными в индуцировании уничтожения миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, что отражалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (отрицательных по пропидий йодиду) миеломных плазматических клеток. Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Эксперименты проводились с использованием аспиратных

образцов костного мозга, взятых у пациента 1 (А), пациента 2 (В), пациента 3 (С), пациента 4 (D), пациента 5 (Е), пациента 6 (F) и пациента 7 (G, H) (смотрите Пример 13).

Фиг. 11. Активация Т-лимфоцитов костного мозга пациента с миеломой в присутствии плазматических клеток костного мозга (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным мультипараметрической проточной цитометрии (8-цветная панель окрашивания). Величину активации Т-лимфоцитов сравнивали между 83A10-TCBcv (А), 42-TCBcv (В) и 22-TCBcv (С) (смотрите Пример 14).

Фиг. 12. Концентрации 83A10-TCBcv, измеренные в образцах сыворотки (закрашенные символы с цельными линиями) и образцах костного мозга (незакрашенные символы с пунктирными линиями) после однократного внутривенного (в/в) введения яванским макакам 0,003, 0,03 и 0,1 мг/кг 83A10-TCBcv. Сбор образцов сыворотки проводили до введения дозы и через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после дозирования. Образцы костного мозга собирали до введения дозы и через 96 и 336 ч после введения дозы (смотрите Пример 16).

Фиг. 13. Перераспределение периферических Т-лимфоцитов, наблюдаемое у яванских макак после однократной внутривенной инъекции 83A10-TCBcv (0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг). Животные А и В, С и D, а также Е и F соответственно получали внутривенную инъекцию 0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг 83A10-TCBcv. Абсолютное количество Т-лимфоцитов в крови (CD2+ клеток на мкл крови) наносили на график в зависимости от времени после обработки (смотрите Пример 16).

Фиг. 14. Уменьшение уровня плазматических клеток крови, наблюдаемое у яванских макак после однократной внутривенной инъекции 83A10-TCBcv (0,3 мг/кг), по данным мультипараметрической проточной цитометрии. Плазматические клетки (ПК) были идентифицированы на основе 6-цветной панели окрашивания, и процент ПК по сравнению с лимфоцитами был измерен и нанесен на контурные графики (А). Строили график кинетики деплетирования плазматических клеток крови после обработки 83A10-TCBcv 0,3 мг/кг у яванских макак (В) (смотрите Пример 16).

Фиг. 15. Противоопухолевая активность, индуцированная биспецифичным анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителом 83A10-TCBcv в модели

ксенотрансплантата миеломы человека H929 с использованием гуманизированных по МКПК мышей NOG. Иммунодефицитные NOD/Shi-scid IL2rgamma(ноль) (NOG) получали в день 0 (Д0) клетки H929 множественной миеломы человека в виде подкожной (п/к) инъекции в правый дорсальный подвздох. В день 15 (Д15) мыши NOG получали однократную внутрибрюшинную (в/б) инъекцию МКПК человека. Мышей затем тщательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля ($n = 9/\text{группу}$) и проводили статистический тест для проверки однородности между группами. Экспериментальными группами были контрольная необработанная группа, обработанная контрольным TCB группа, обработанная 2,6 нМ/кг 83A10-TCBscv группа, и обработанная 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® (BCMAxCD3 (scFv)₂) группа. Лечение антителами, проводимое путем инъекции в хвостовую вену, начинали на 19-й день (Д19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929. Схема лечения антителом TCB состояла из внутривенного введения один раз в неделю в течение 3 недель (то есть всего 3 инъекции антитела TCB). Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. ОО (мм³) в зависимости от дня после опухолевой инъекции. В день 19, первый день лечения, средний объем опухоли достигал 300 ± 161 мм³ для контрольной группы, обработанной носителем (А), 315 ± 148 мм³ для группы, обработанной 2,6 нМ/кг контрольного TCB (А), 293 ± 135 мм³ для группы 2,6 нМ/кг 83A10-TCBscv (В) и 307 ± 138 мм³ для группы 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® (С). ОО каждой отдельной мыши для каждой экспериментальной группы наносили на график в зависимости от дня после опухолевой инъекции: (А) контрольные группы, включающие контроль в виде носителя (цельная линия) и контрольного TCB (пунктирная линия), (В) группа 83A10-TCBscv (2,6 нМ/кг) и (С) BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг). Черные стрелки показывают лечение TCB, проводимое путем внутривенной инъекцией. В группе 83A10-TCBscv (2,6 нМ/кг) у 6 из 9 мышей (67%) опухоль регрессировала даже ниже ОО, записанного в Д19, то есть первое лечение TCB и регрессия опухоли сохранялись до прекращения исследования. У 3 мышей в группе, обработанной 83A10-TCBscv (2,6 нМ/кг), которые не продемонстрировали регрессию опухоли, имели ОО, составляющие 376, 402 и 522 мм³ соответственно в Д19. Напротив, ни у одной из 9 мышей (0%), получавших эквивалентную дозу BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг) по схеме один раз в неделю в течение

3 недель, не наблюдали регрессии опухоли в какой-либо момент времени (смотрите Пример 17).

Фиг. 16. Процент роста опухоли (РО) рассчитывали для Д19-Д43 и сравнивали между группой 83A10-TCBcv (2,6 нМ/кг) и BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг). Процент роста опухоли, обозначенный как РО (%), определяли путем вычисления $PO (\%) = 100 \times (\text{медианное значение ОО анализируемой группы}) / (\text{медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель})$. По этическим причинам мышей умерщвляли, когда ОО достигал по меньшей мере 2000 мм³. РО (%) постепенно и значительно снижался в группе 83A10-TCBcv (2,6 нМ/кг), а также РО (%) всегда был ниже по сравнению с BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг) (смотрите Пример 17).

Фиг. 17. Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) 70 клонов, выбранных из ИФА. Все эксперименты проводились при 25 °С с использованием PBST в качестве рабочего буфера (10 мМ ФСБ, pH 7,4 и 0,005% (об./об.) Tween®20) с биосенсором ProteOn XPR36, снабженным сенсорными чипами GLC и GLM, и реагентами связывания. Иммуобилизации проводили при скорости 30 мкл/мин на чипе GLM. pAb (козы) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфическое Ab (Jackson) связывали в вертикальном направлении, используя стандартную процедуру аминного связывания: все шесть лигандных каналов активировали в течение 5 минут смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Сразу после активации поверхностей в течение 5 минут через все шесть каналов инъецировали pAb (кози) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичное антитело (50 мкг/мл, 10 мМ ацетата натрия, pH 5). Наконец, каналы блокировали 5-минутной инъекцией 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5). Конечные уровни иммуобилизации были похожими на всех каналах, в пределах от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab были захвачены из супернатантов *E. coli* путем одновременной инъекцией по пяти раздельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 минут, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль «в системе» в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений BCMA человека и яванского макака (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 минут по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 минут. Кинетические данные были проанализированы в ProteOn Manager

v. 2.1. Обработка данных реакции точки включала применение этапа межточкового сопоставления и шага двойного сопоставления с применением буферного контроля «в системе» (Myszka, 1999). Обработанные данные из повторных однократных инъекций соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Фиг. 18. Аффинность связывания антител к ВСМА на клетках НЕК-huBCMA, измеренная с помощью проточной цитометрии. Анти-ВСМА антитела использовали в качестве первого антитела, затем в качестве антитела обнаружения использовали вторичный меченый РЕ анти-человеческий Fc. Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значительно лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК.

Фиг. 19. Концентрации 42-ТСВсv измеряли в сыворотке и костном мозге после однократной в/в или п/к инъекции у яванских макаков. Животные получали однократную в/в или п/к инъекцию 42-ТСВсv, и образцы крови в определенный момент времени отбирали через периферическую вену для оценки ФК при предварительной дозе, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336 через 504 ч после дозирования. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученную сыворотку хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 минут при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученный костный мозг хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценивание ФК данных. Стандартный не компартментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Диапазон эффективных концентраций 42-ТСВсv в аспиратах костного мозга пациентов с множественной миеломой составляет от 10 пМ до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ.

Фиг. 20. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами лейкозных клеток костного мозга пациента с плазмноклеточным лейкозом в присутствии аутологичных Т-лимфоцитов или инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга, индуцировался биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Определяли процент миеломных плазматических клеток с отрицательной реакцией на пропидий йодид, и наносили на график процент жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга относительно контроля в виде питательной среды (МС) в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали (А, В) зависимый от концентрации и специфичный лизис клеток плазмноклеточного лейкоза пациента, в то же время не наблюдали (Н) лизис микросреды костного мозга (ВММЕ) (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ. 42-ТСВсv было очень эффективным для индуцирования уничтожения клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга пациента, что отображалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (отрицательных по пропидий йодиду) миеломных плазматических клеток. Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), < 1% (**) или <0,1% (***). Фигура иллюстрирует результаты, полученные на образцах костного мозга пациента 1 (А) и пациента 2 (В) (смотрите также Пример 20).

Фиг. 21. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток H929 MM, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами в комбинации с производными талидомида (леналидомид) или иммунотерапевтическими производными (анти-PD1 и анти-CD38 антителами), по данным проточной цитометрии. Клетки MM H929 совместно культивировали с лейкоцитами человека (n = 1 или 5) и подвергали субоптимальным концентрациям биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела - только А) 83A10-ТСсv (10 пМ), или только В) 42-ТСВсv (10 пМ), в комбинации с субоптимальными концентрациями леналидомида (1 мкМ), анти-PD-1 (10 мкг/мл) и анти-CD38 даратумумаба (10 мкг/мл). Комбинирование биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела 83A10-ТСВсv (n = 5) с леналидомидом или анти-CD38 даратумумабом значительно увеличивало их анти-MM эффективность в 4 и 2,5 раза

соответственно (А). Комбинирование 42-TCBcv ($n = 1$) с леналидомидом или даратумумабом также увеличивало их анти-ММ эффективность в уничтожении клеточных линий ММ (В).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как применяется в данном документе термин «BCMA, BCMA-мишень, BCMA человека» относится к В-клеточному антигену созревания человека, также известному как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), который является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, которое преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках. Внеклеточный домен BCMA состоит в соответствии с UniProt из аминокислот 1 - 54 (или 5-51). Как применяется в данном документе, термин «антитело к BCMA, анти-BCMA антитело» относится к антителу, специфически связывающемуся с внеклеточным доменом BCMA.

«Специфическое связывание с BCMA или связывание с BCMA» относится к антителу, которое способно связываться с BCMA-мишенью с достаточной аффинностью, так что антитело является полезным в качестве терапевтического агента для нацеливания на BCMA. В некоторых вариантах осуществления, степень связывания анти-BCMA антитела с белком, не родственным BCMA, примерно в 10 раз, предпочтительно больше чем в 100 раз меньше, чем связывание антитела с BCMA, как измерено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например Biacore®, иммуноферментного анализа (ИФА) или проточной цитометрии (FACS). В одном варианте осуществления, антитело, которое связывается с BCMA, имеет константу диссоциации (K_D) 10^{-8} М или меньше, предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-13} М, предпочтительно от 10^{-9} М до 10^{-13} М. В одном варианте осуществления, анти-BCMA антитело связывается с эпитопом BCMA, который является консервативным среди BCMA разных видов, предпочтительно для человека и яванского макака, и, кроме того, предпочтительно также для BCMA мыши и крысы. «Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с CD3 и BCMA, биспецифичное антитело к CD3 и BCMA» относится к соответствующему определению связывания с обеими мишенями. Антитело, специфически связывающееся с BCMA (или BCMA и CD3), не связывается с другими человеческими антигенами. Поэтому в ИФА значения OD для таких несвязанных

мишеней будут составлять или будут ниже значения предела обнаружения специфического анализа, предпочтительно $> 0,3$ нг/мл, или составлять или будут ниже значений OD контрольных образцов без связанного с плашкой ВСМА или с нетрансфицированными клетками НЕК293.

Предпочтительно анти-ВСМА антитело специфически связывается с группой ВСМА, состоящей из ВСМА человека и ВСМА не относящегося к человеку млекопитающего источника, предпочтительно ВСМА из яванского макака, мыши и/или крысы. «Разница для яванского макака/человека» относится к соотношению аффинности КД ВСМА яванского макака [М]/КД ВСМА человека [М] (подробности смотрите в Примере 3). «Разница по Mab CD3 для яванского макака/человека» в контексте данного документа относится к соотношению аффинности КД CD3 яванского макака [М]/КД CD3 человека [М]. В одном варианте осуществления, биспецифичное анти-ВСМА/анти-CD3 антитело согласно данному изобретению демонстрирует разницу по Mab CD3 для яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Биспецифичное антитело согласно данному изобретению в одном варианте осуществления характеризуется тем, что оно также специфически связывается с CD3 яванского макака. В одном варианте осуществления, биспецифичное анти-ВСМА/анти-CD3 антитело согласно данному изобретению демонстрирует разницу по Mab CD3 для яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Предпочтительно разница для яванского макака/человека находится в одном и том же диапазоне для анти-ВСМА и анти-CD3 антитела.

Как применяется в данном документе, термин «APRIL» относится к рекомбинантному укороченному APRIL мыши (аминокислоты 106–241; NP_076006). APRIL может быть продуцирован, как описано в Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009–18).

Как применяется в данном документе, термин «BAFF» относится к рекомбинантному укороченному BAFF человека (UniProt Q9Y275 (TN13B_HUMAN)), который может быть получен, как описано в Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Предпочтительно His-тэгируемый BAFF используется согласно данному изобретению. Предпочтительно His-тэгируемый BAFF продуцируют путем клонирования фрагмента ДНК, кодирующего остатки 82-285 BAFF, в вектор экспрессии, создавая гибрид с N-концевым His-тэгом, с сайтом расщепления

тромбином, экспрессируя указанный вектор и расщепляя выделенный белок тромбином.

Анти-BCMA антитела анализируют с помощью ИФА на связывание с BCMA человека с использованием связанного с плашкой BCMA. Для данного анализа используют количество связанного с плашкой BCMA, составляющее предпочтительно 1,5 мкг/мл, и концентрацию(ии) в диапазоне от 0,1 до 200 нМ анти-BCMA антитела.

Как применяется в данном документе, термин «NF-κB» относится к рекомбинантному NF-κB p50 (номер доступа P19838). Активность NF-κB может быть измерена с помощью ДНК-связывающего ИФА экстракта клеток NCI-H929 MM (CRL-9068™). Клетки NCI-H929 MM, необработанные или обработанные 0,1 мкг/мл ФНО-α, 1000 нг/мл термообработанного HT-укороченного BAFF, 1000 нг/мл укороченного BAFF, от 0,1 пМ до 200 нМ контроля изотипа, и с или без 0,1 пМ до 200 нМ анти-BCMA антитела инкубируют в течение 20 мин. Активность NF-κB может быть проанализирована с использованием функционального ИФА, который обнаруживает хемилюминесцентный сигнал от p65, связанного с консенсусной последовательностью NF-κB (US6150090).

Как применяется в данном документе, термин «дополнительная мишень» предпочтительно означает CD3ε. Термин «первая мишень и вторая мишень» означает либо CD3 в качестве первой мишени и BCMA в качестве второй мишени, либо означает BCMA в качестве первой мишени и CD3 в качестве второй мишени.

Как применяется в данном документе, термин «CD3ε или CD3» относится к CD3 ε человека, описанному в UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин «антитело к CD3ε, антитело к CD3ε» относится к антителу, специфически связывающемуся с CD3ε. В одном варианте осуществления, антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO:1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответственно CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи, и переменный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO:4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответственно CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи. В одном варианте осуществления, антитело содержит переменные домены SEQ ID NO:7 (VH) и SEQ ID NO:8 (VL).

Как применяется в данном документе, термин «анти-CD38 антитело» относится к антителу, специфически связывающемуся с CD38 человека. В варианте осуществления изобретения, анти-CD38 антитело представляет собой даратумумаб

(US20150246123). В варианте осуществления изобретения, анти-CD38 антитело представляет собой изатаксимаб (SAR650984, US8877899). В варианте осуществления изобретения, анти-CD38 антитело представляет собой MOR202 (WO 2012041800). В варианте осуществления изобретения, анти-CD38 антитело представляет собой Ab79 (US8362211). В варианте осуществления изобретения, анти-CD38 антитело представляет собой Ab19 (US8362211). Дозирование такого анти-CD38 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, доза даратумумаба обычно составляет 16 мг/кг (www.ema.europa.eu).

Как применяется в данном документе, термин «соединение талидомида» или «талидомид и иммунотерапевтическое производное» относится к 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диону и его иммунотерапевтическому производному. В варианте осуществления изобретения, соединение талидомида выбирают из группы, состоящей из, но неограниченной лишь этими: талидомида (регистрационный номер CAS 50-35-1), леналидомида (регистрационный номер CAS 191732-72-6), помалидомида (регистрационный номер CAS 19171-19-8), CC122 (регистрационный номер CAS 1398053-45-6) и CC-220 (регистрационный номер CAS 1323403-33-3) и их соответствующих солей (предпочтительно HCl-соли 1:1). Химическая формула CC-122 представляет собой 2,6-пиперидиндион, 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-3(4H-хиназолинил), гидрохлорид (1:1), и для CC-220 - 2,6-пиперидиндион, 3-[1,3-дигидро-4 -[[4-(4-морфолинилметил)фенил]метокси]-1-оксо-2H-изоиндол-2-ил]-, (3S)-, гидрохлорид (1:1). Способы получения CC-220 описаны, например, в US 20110196150, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

Дозирование таломидных соединений выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, доза Revlimid® (леналидомид) обычно составляет 25 мг один раз в сутки перорально в дни 1-21 повторяющихся 28-суточных циклов (www.revlimid.com), а доза POMALYST® (помалидомид) для лечения множественной миеломы обычно составляет 4 мг в сутки, принимаемая перорально в дни 1-21 повторяющихся 28-дневных циклов (www.celgene.com). В одном варианте осуществления, 3-(5-амино-

2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион вводят в количестве от около 5 до около 50 мг в сутки.

В одном варианте осуществления, СС-122 и СС-220 вводят в количестве от около 5 до около 25 мг в сутки. В другом варианте осуществления, СС-122 и СС-220 вводят в количестве около 5, 10, 15, 25, 30 или 50 мг в сутки. В другом варианте осуществления, в сутки вводят 10 или 25 мг СС-122 и СС-220. В одном варианте осуществления, СС-122 и СС-220 вводят два раза в сутки.

Как применяется в данном документе, термин «анти-PD-1 антитело» относится к антителу, специфически связывающемуся с PD-1 человека. Такими антителами являются, например, описанные в WO2015026634 (МК-3475, пембролизумаб), US7521051, US8008449 и US8354509. Пембролизумаб (Keytruda®, МК-3475) также описан в WO 2009/114335, Poole, R.M. Drugs (2014) 74: 1973; Seiwert, T., et al., J. Clin. Oncol. 32,5s (suppl;abstr 6011). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой МК-3475 (WHO Drug Information, Vol. 27, No. 2, pages 161-162 (2013)) и содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные на Фиг.6 WO 2015026634. Аминокислотная последовательность пембролизумаба описана в WO2008156712 (CDR SEQ ID NO:15, 16 и 17 легкой цепи и CDR SEQ ID NO:18, 19 и 20 тяжелой цепи). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (BMS-936558, MDX 1106; WHO Drug Information, Vol. 27, No. 1, pages 68-69 (2013), WO2006/121168, аминокислотные последовательности показаны в WO 2015026634). В варианте осуществления изобретения, антитело PD-1 представляет собой пидилизумаб (СТ-011, также известное как hBAT или hBAT-1; аминокислотную последовательность смотрите в WO 2003/099196; WO 2009/101611, Fried I. et al.; Neuro Oncol (2014) 16 (Suppl 5): v111-v112.). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой MEDI-0680 (AMP-514, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, Hamid O. et al.; J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr TPS3087)). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой PDR001 (Naing A. et al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3060)). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-1 представляет собой REGN2810 (Papadopoulos KP et al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3024)). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой ламбролизумаб (WO2008/156712). В варианте

осуществления изобретения, антитело PD-1 представляет собой h409A11, h409A16 или h409A17, которые описаны в WO2008/156712. Дозирование такого анти-PD-1 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, Keytruda® обычно вводят в концентрации 2 мг/кг массы тела раз в три недели (<http://ec.europa.eu/health/documents>).

Как применяется в данном документе, термин «анти-PD-L1 антитело» относится к антителу, специфически связывающемуся с PD-L1 человека. Такие антителами, например, описаны в WO2015026634, WO2013/019906, WO2010/077634 и US8383796. В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой MPDL3280A (атезолизумаб, YW243.55.S70, WO2010/077634, McDermott DF. Et al., JCO March 10, 2016 vol. 34 no. 8 833-842). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой MDX-1105. (BMS-936559, WO2007/005874, Patrick A. Ott PA et al., DOI: 10.1158/1078-0432, Clinical Cancer Research-13-0143). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб, WO 2016/040238 Gilbert J. et al., Journal for ImmunoTherapy of Cancer 20153(Suppl 2):P152). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой MSB001071 8C (авелумаб, Disis ML. et al., Journal of Clinical Oncology, Vol 33, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 5509). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело, содержащее последовательность VH SEQ ID NO:16 и последовательность VL SEQ ID NO:17, как описано в WO2016007235. Дозирование такого анти-PD-L1 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, атезолизумаб обычно вводят в концентрации 1200 мг в виде внутривенной инфузии в течение 60 минут раз в 3 недели (www.accessdata.fda.gov).

Как применяется в данном документе, термин «антитело» относится к моноклональному антителу. Антитело состоит из двух пар «легкая цепь» (LC) и «тяжелая цепь» (HC) (такие пары легкая цепь (LC)/тяжелая цепь в данном документе сокращенно обозначены как LC/HC). Легкие цепи и тяжелые цепи таких антител представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких доменов. Каждая

тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит константные домены тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3 (антитела класса IgA, IgD и IgG) и, необязательно, константный домен тяжелой цепи CH4 (антитела класса IgE и IgM). Каждая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи VL и константный домен легкой цепи CL. Переменные домены VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Константные домены» тяжелой цепи и легкой цепи не участвуют непосредственно в связывании антитела с мишенью, но проявляют различные эффекторные функции. Как применяется в данном документе, термин «антитело» относится также к той части антитела, которая необходима, по меньшей мере, для специфического связывания с антигеном CD3, и соответствующим BCMA. Следовательно, такое антитело (или часть антитела) может быть, в одном варианте осуществления, фрагментом Fab, если указанная часть антитела содержится в биспецифичном антителе согласно данному изобретению. Антитело согласно данному изобретению также может представлять собой Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv, или вовлекающий биспецифичный активатор Т-лимфоцитов (BiTE).

Термин «антитело» включает в себя, например, мышиные антитела, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и сконструированные с помощью генной инженерии антитела (варианты или мутантные антитела) до тех пор, пока сохраняются их характерные свойства. Особенно предпочтительными являются человеческие или гуманизированные антитела, в частности в качестве рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител. Дополнительные варианты осуществления представляют собой гетероспецифичные антитела (биспецифичные, триспецифичные и т. д.) и другие конъюгаты, например, с малыми цитотоксическими молекулами.

Термин «биспецифичное антитело», как применяется в данном документе, относится в одном варианте осуществления, к антителу, в котором одна из двух пар тяжелой цепи и легкой цепи (HC/LC) специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с BCMA. Термин также относится к другим формам биспецифичных антител в соответствии с уровнем техники, в одном варианте осуществления, к биспецифичным одноцепочечным антителам.

Как применяется в данном документе, термин «TCB» относится к биспецифичному антителу, специфично связывающемуся с BCMA и CD3. Как применяется в данном документе, термин «83A10-TCB_{scv}» относится к биспецифичному антителу, специфично связывающемуся с BCMA и CD3, как определено его комбинацией тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 (2x) и SEQ ID NO:48, и как показано на Фиг. 2A и описано в EP14179705. Как применяется в данном документе, термины «21-TCB_{scv}, 22-TCB_{scv}, 42-TCB_{scv}» относятся к соответствующим биспецифичным антителам: Mab21, как определено его комбинацией тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51 (2x), Mab 22, как определено его комбинациями тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:54 (2x), и Mab42, как определено его комбинацией тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO:48 из SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57-(2x).

Как применяется в данном документе, термин «не конъюгированное антитело» относится к антителу, которое специфично связывается с BCMA, содержит часть Fc и не конъюгировано с терапевтическим агентом, например с цитотоксическим агентом или радиоактивной меткой. Как применяется в данном документе, термин «конъюгированное антитело, лекарственный конъюгат» относится к антителу, которое специфично связывается с BCMA и конъюгировано с терапевтическим агентом, например, с цитотоксичным агентом или радиоактивной меткой.

Как применяется в данном документе, термин «биспецифичное одноцепочечное антитело» относится к единой полипептидной цепи, содержащей, в одном варианте осуществления, два связывающих домена, один из которых специфично связывается с BCMA, а другой, в одном варианте осуществления, специфично связывается с CD3. Каждый связывающий домен содержит одну переменную область тяжелой цепи антитела («область VH»), причем область VH первого

связывающего домена специфично связывается с молекулой CD3, а область VH второго связывающего домена специфично связывается с BCMA. Два связывающих домена необязательно соединены друг с другом коротким полипептидным спейсером. Неограничивающим примером полипептидного спейсера является Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) и его повторы. Каждый связывающий домен может дополнительно содержать одну вариабельную область из легкой цепи антитела («область VL»), область VH и область VL в каждом первом и втором связывающих доменах, соединенных друг с другом через полипептидный линкер, достаточно длинный, чтобы сделать возможным спаривание области VH и области VL первого связывающего домена и области VH и области VL второго связывающего домена с друг с другом таким образом, что вместе они способны специфично связываться с соответствующими первым и вторым связывающими доменами (смотрите, например, EP0623679). Также упоминаются биспецифичные одноцепочечные антитела, например в Choi BD et al., Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul;11(7):843-53 и Wolf E. et al., Drug Discov Today. 2005 Sep 15;10(18):1237-44.

Как применяется в данном документе, термин «диатело» относится к небольшому бивалентному и биспецифичному фрагменту антитела, содержащему вариабельный домен тяжелой (VH) цепи, соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL), соединенные пептидным линкером, который является слишком коротким, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами в той же цепи (Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772). Это вызывает спаривание с комплементарными доменами другой цепи и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антиген-связывающими сайтами. Чтобы сконструировать биспецифичные диатела согласно данному изобретению, V-домены анти-CD3 антитела и анти-BCMA антитела соединяют, чтобы создать две цепи VH(CD3)-VL(BCMA), VH(BCMA)-VL(CD3). Каждая цепь сама по себе не может связываться с соответствующим антигеном, но воссоздает функциональные сайты связывания антигена анти-CD3 антитела и анти-BCMA антитела при спаривании с другой цепью. Две молекулы scFv с линкером между вариабельным доменом тяжелой цепи и вариабельным доменом легкой цепи, который является слишком коротким для внутримолекулярной димеризации, коэкспрессируются и самособираются для формирования биспецифичных молекул

с двумя сайтами связывания на противоположных концах. В качестве примера, переменные области, кодирующие связывающие домены к ВСМА и CD3, соответственно, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР из конструкций ДНК, полученных, как описано, так что они могут быть клонированы в вектор, подобный pHOG, как описано в Kipiryanov et al., J. Immunol. Methods, 200, 69-77 (1997a). Две конструкции scFV затем объединяют в один вектор экспрессии в желаемой ориентации, в результате чего линкер VH-VL укорачивается, чтобы предотвратить обратное сворачивание цепей с самими собой. Сегменты ДНК разделены стоп-кодоном и сайтом связывания рибосомы (RBS). RBS делает возможным транскрипцию мРНК в виде бицистронной матричной РНК, которая транслируется рибосомами в два белка, которые нековалентно взаимодействуют с образованием молекулы диатела. Диатела, как и другие фрагменты антител, имеют преимущество в том, что они могут быть экспрессированы в бактериях (*E. coli*) и дрожжах (*Pichia pastoris*) в функциональной форме и с высоким выходом (вплоть до 1 г/л).

Как применяется в данном документе, термин «тандемные scFV» относится к одноцепочечной молекуле Fv (то есть к молекуле, образованной в результате объединения переменных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, VH и VL соответственно), как описано, например, в WO 03/025018 и WO 03/048209. Такие молекулы Fv, которые известны как TandAbs®, содержат четыре переменных домена антитела, причем (i) либо первые два, либо последние два из четырех переменных доменов внутримолекулярно связываются друг с другом в одной и той же цепи, формируя антиген-связывающий scFv в ориентации VH/VL или VL/VH, (ii) два других домена связываются межмолекулярно с соответствующими доменами VH или VL другой цепи с образованием антиген-связывающих пар VH/VL. В предпочтительном варианте осуществления, как упомянуто в WO 03/025018, мономеры такой молекулы Fv содержат, по меньшей мере, четыре переменных домена, из которых два соседних домена одного мономера образуют антиген-связывающую единицу VH-VL или VL-VH scFv.

Как применяется в данном документе, термин «DARPs» относится к молекуле биспецифичного анкиринового повтора, как описано, например, в US 2009082274. Такие молекулы получены из природных анкириновых белков, которые можно найти в геноме человека, и являются одним из наиболее распространенных типов

связывающих белков. Модуль библиотеки DARPIn определяется природными белковыми последовательностями анкириновых повторов, используя 229 анкириновых повторов для первоначального дизайна и еще 2200 для последующего уточнения. Модули служат строительными блоками для библиотек DARPIn. Модули библиотеки напоминают последовательности генома человека. DARPIn состоит из 4-6 модулей. Потому что каждый модуль примерно 3,5 кДа, размер среднего DARPIn составляет 16-21 кДа. Выбор связывателей осуществляется с помощью рибосомного дисплея, который является полностью бесклеточным и описан в He M and Taussig MJ., *Biochem Soc Trans.* 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

Термин «вовлекающий биспецифичный активатор Т-лимфоцитов» обозначает гибридные белки, состоящие из двух одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) различных антител, или аминокислотных последовательностей из четырех разных генов в одной пептидной цепи длиной около 55 килодактон. Один из scFv связывается с Т-лимфоцитами через рецептор CD3, а другой - с BCMA.

Существует пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, обозначаемых греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ (Janeway CA, Jr et al (2001). *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing). Тип присутствующей тяжелой цепи определяет класс антитела; эти цепи обнаружены в антителах IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). *Human Physiology*, 4th ed., Thomson Learning). Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и γ содержат примерно 450 аминокислот, тогда как μ и ϵ содержат примерно 550 аминокислот.

Каждая тяжелая цепь имеет две области: константную область и вариабельную область. Константная область идентична у всех антител одного и того же изотипа, но отличается у антител разных изотипов. Тяжелые цепи γ , α и δ имеют константную область, состоящую из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (в ряд), и шарнирную область для дополнительной гибкости (Woof J, Burton D *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 89-99); тяжелые цепи μ и ϵ имеют константную область, состоящую из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway CA, Jr et al (2001). *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing). Вариабельная область тяжелой цепи отличается у антител, продуцируемых разными В-лимфоцитами, но одинакова для всех антител, продуцируемых одним В-лимфоцитом или клоном В-лимфоцита.

Вариабельная область каждой тяжелой цепи имеет длину примерно 110 аминокислот и состоит из одного домена антитела.

У млекопитающих есть только два типа легких цепей, которые называются лямбда (λ) и каппа (κ). Легкая цепь имеет два следующих друг за другом домена: один константный домен CL и один вариабельный домен VL. Примерная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. В одном варианте осуществления, легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа (κ), и константный домен CL, в одном варианте осуществления, получают из легкой цепи каппа (κ) (константный домен CK).

Как применяется в данном документе, термин «аминокислотная замена» относится к независимой аминокислотной замене в константном домене CH1 аминокислоты в позициях 147 и 213 на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и в константном домене CL аминокислота в позиции 124 замещена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). Дополнительно, в одном варианте осуществления, в константном домене CL аминокислота в позиции 123 независимо замещена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). В одном варианте осуществления, аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. Аминокислотные замены находятся либо в CD3 Fab, либо в одном или двух BCMA Fab. Биспецифичные антитела к BCMA и CD3 в качестве вариантов по заряду описаны в EP14179705, раскрытом посредством ссылки (далее называемые «варианты по заряду, соответственно варианты по смене заряда»).

Все нумерации аминокислот в данном документе соответствуют таким Кабата (Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242).

Как применяется в данном документе, термины «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» относятся к препарату молекул антитела одного аминокислотного состава.

«Антитела» согласно данному изобретению могут быть любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG или IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1), в результате чего оба антитела, из которых получено бивалентное биспецифичное антитело согласно

данному изобретению, имеют часть Fc того же подкласса (например, IgG1, IgG4 и т. п., предпочтительно IgG1), предпочтительно одного и того же аллотипа (например, европейского).

«Часть Fc антитела» является термином, хорошо известным специалисту в данной области техники, и определяется исходя из расщепления антител папаином. В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело содержит в качестве части Fc, в одном варианте осуществления, часть Fc, полученную из человеческого источника, и предпочтительно все другие части человеческих константных областей. Часть Fc антитела прямо участвует в активации комплемента, связывании C1q, активации C3 и связывании рецептора Fc. В то время как влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными сайтами связывания в части Fc. Такие сайты связывания известны в данной области техники и описаны, например, Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., и Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; и EP 0 307 434.

Таковыми сайтами связывания являются, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии нумерации EU Кабата). Антитела подкласса IgG1, IgG2 и IgG3 обычно демонстрируют активацию комплемента, связывание C1q и активацию C3, тогда как IgG4 не активируют систему комплемента, не связывают C1q и не активируют C3. В одном варианте осуществления, часть Fc представляет собой часть Fc человека.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело содержит вариант Fc Fc-области человеческого IgG дикого типа, причем указанный вариант Fc содержит аминокислотную замену в позиции Pro329 и, по меньшей мере, одну дополнительную аминокислотную замену, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU Кабата, и при этом указанное антитело проявляет уменьшенную аффинность к FcγRIIIA и/или FcγRIIA и/или FcγRI по сравнению с антителом, содержащим область Fc IgG дикого типа, и при этом АЗКЦ, индуцированная указанным антителом уменьшается по меньшей мере до

20% от A3KЦ, индуцированной антителом, содержащим область Fc человеческого IgG дикого типа. В конкретном варианте осуществления, Pro329 человеческой области Fc дикого типа в биспецифичном антителе замещен глицином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения пролиновой структуры типа «сэндвич» в интерфейсе Fc/Fc γ -рецептора, который образуется между пролином 329 Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 Fc γ RIII (Sondermann et al.: Nature 406, 267-273 (20 July 2000)). В дополнительном аспекте изобретения, по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена в варианте Fc представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S, и, тем не менее, в другом варианте осуществления указанная по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена представляет собой L234A и L235A области Fc IgG1 человека, или S228P и L235E области Fc IgG4 человека. Такие варианты Fc подробно описаны в WO2012130831.

Как применяется в данном документе, под «эффекторной функцией» подразумевается биохимическое событие, которое возникает в результате взаимодействия области Fc антитела с рецептором Fc или лигандом. Эффекторные функции включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: A3KЦ, A3KF (антителозависимый клеточный фагоцитоз), и K3Ц (комплементзависимая цитотоксичность). Как применяется в данном документе, под «эффекторной клеткой» подразумевается клетка иммунной системы, которая экспрессирует один или большее количество рецепторов Fc и опосредует одну или большее количество эффекторных функций. Эффекторные клетки включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-лимфоциты, крупные гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, и могут быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Под «библиотекой» в данном документе подразумевается набор вариантов Fc в любой форме, включая в себя, но не ограничиваясь лишь этими: список нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, список нуклеотидных или аминокислотных замен в переменных позициях, физическую библиотеку, содержащую нуклеиновые кислоты, которые кодируют последовательности библиотеки, или физическую

библиотеку, содержащую варианты белки Fc, в очищенной или неочищенной форме.

Как применяется в данном документе, термин «гамма-рецептор Fc» или «FcγR» означает любой член семейства белков, которые связываются с областью Fc антитела IgG и по существу кодируются генами FcγR. У людей это семейство включает в себя, но не ограничивается FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb, и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2), и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая изотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65), а также любые неизвестные изоформы или аллотипы FcγRs или FcγR человека. FcγR может быть из любого организма, включая в себя, но не ограничиваясь людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Мышиные FcγRs включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), и FcγRIII-2 (CD16-2), а также любые неизвестные изоформы или аллотипы FcγR или FcγR мыши.

Как применяется в данном документе, термин «вариант Fc с усиленной эффекторной функцией» означает последовательность Fc, которая отличается от исходной последовательности Fc по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, или относится к другим модификациям, таким как изменение гликозилирования, например, по Asn279, которые усиливают эффекторные функции. Такими модификациями являются, например, упомянутые в Duncan et al., 1988, *Nature* 332:563-564; Lund et al., 1991, *J Immunol* 147:2657-2662; Lund et al., 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre et al., 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, *Immunol Lett* 44:111-117; Lund et al., 1995, *Faseb J* 9:115-119; Jefferis et al., 1996, *Immunol Lett* 54:101-104; Lund et al., 1996, *J Immunol* 157:4963-4969; Armour et al., 1999, *Eur J Immunol* 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, *J Immunol* 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, *J Immunol* 164:1925-1933; Xu et al., 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Idusogie et al., 2001, *J Immunol* 166:2571-2575; Shields et al., 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; Presta et al., 2002, *Biochem Soc Trans* 30:487-490; US5624821; US5885573; US6194551; WO200042072; WO199958572.

Такие модификации Fc также включают в себя сконструированные в соответствии с изобретением гликоформы части Fc. Под «сконструированной гликоформой», как применяется в данном документе, подразумевается углеводная композиция, которую ковалентно присоединяют к полипептиду Fc, причем указанная углеводная композиция химически отличается от композиции исходного полипептида Fc. Сконструированные гликоформы могут быть получены любым способом, например, с использованием сконструированных или вариантных экспрессионных штаммов, путем коэкспрессии с одним или большим количеством ферментов, например, D1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазой III (GnTIII), путем экспрессии полипептида Fc в различных организмах или клеточных линиях из различных организмов, или путем модификации углеводов после экспрессии полипептида Fc. Способы получения сконструированных гликоформ известны в данной области техники и упомянуты в Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US6602684; WO200061739; WO200129246; WO200231140; WO200230954; технология Potelligent™ (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); технология разработки гликозилирования GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Цюрих, Швейцария)). Сконструированная гликоформа обычно относится к другой углеводной или олигосахаридной композиции, чем исходный полипептид Fc.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичное антитело содержит вариант Fc с усиленной эффекторной функцией, проявляющий высокую аффинность связывания с Fc-гамма рецептором III (FcγRIII, CD 16a). Высокая аффинность связывания с FcγRIII означает, что связывание усилено для CD16a/F158 по меньшей мере в 10 раз по сравнению с исходным антителом (95% фукозилирование), в качестве стандарта экспрессируемого в клетках-хозяевах CHO, таких как клетки DG44 CHO или K1 CHO, или/и связывание усилено для CD16a/V158 по меньшей мере в 20 раз по сравнению с исходным антителом, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием иммобилизованного CD 16a при концентрации антитела 100 нМ. Связывание FcγRIII может быть усилено с помощью способов согласно уровню техники, например, путем модификации аминокислотной последовательности части Fc или гликозилирования части Fc антитела (смотрите, например, EP2235061). Mori, K et al., Cytotechnology 55

(2007)109 и Satoh M, et al., Expert Opin Biol Ther. 6 (2006) 1161-1173 относятся к линии СНО с нокаутированным геном FUT8 (α -1,6-фукозилтрансфераза) для продуцирования афукозилированных антител.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, содержащему вариабельную область, то есть связывающую область, из одного источника или вида и, по меньшей мере, часть константной области, полученную из другого источника или вида, обычно полученную методами рекомбинантной ДНК. Химерные антитела, содержащие мышиную вариабельную область и человеческую константную область, являются предпочтительными. Другими предпочтительными формами «химерных антител», охватываемых данным изобретением, являются те, в которых константная область была модифицирована или изменена по сравнению с таковой исходного антитела, для получения свойств согласно данному изобретению, особенно в отношении связывания C1q и/или связывания Fc рецептора (FcR). Такие химерные антитела также называют «антителами с измененным классом». Химерные антитела являются продуктом экспрессированных генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, кодирующие вариабельные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулинов. Способы получения химерных антител включают в себя обычные методы рекомбинантных ДНК и трансфекции генов, хорошо известные в данной области техники. Смотрите, например, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США № 5202238 и 5204244.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркас или «определяющие комплементарность области» (CDR) были модифицированы так, что содержат CDR иммуноглобулина отличающейся специфичности по сравнению с таковой исходного иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления, мышиную CDR вставляют в каркасную область человеческого антитела для получения «гуманизированного антитела». Смотрите, например, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; и Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Другие формы «гуманизированных антител», охватываемые данным изобретением, представляют собой те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с формой исходного

антитела для создания свойств согласно данному изобретению, в частности в отношении связывания C1q и/или связывания рецептора Fc (FcR).

Как применяется в данном документе, термин «человеческое антитело» включает в себя антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела хорошо известны в данной области техники (van Dijk, M.A., и van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела могут также продуцироваться в трансгенных животных (например, мышах), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар или выборку человеческих антител при отсутствии продуцирования эндогенных иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в такие зародышевые линии мутантных мышей приведет к продуцированию антител человека (смотрите, например, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Человеческие антитела также могут быть получены в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom, H.R., и Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Методы Cole et al. и Boerner et al. также доступны для приготовления человеческих моноклональных антител (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); и Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Как уже упоминалось для химерных и гуманизированных антител согласно данному изобретению, термин «человеческое антитело», как применяется в данном документе, также включает в себя такие антитела, которые модифицированы в константной области для получения свойств согласно данному изобретению, особенно в отношении связывания с C1q и/или связывания с FcR, например, путем «переключения классов», т. е. изменения или мутации частей Fc (например, из IgG1 в IgG4 и/или мутации IgG1/IgG4).

Термин «рекомбинантное человеческое антитело», как применяется в данном документе, предназначен для включения в себя всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как клетка NSO или CHO, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам

иммуноглобулинов человека или антителах, экспрессируемых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области в перекомпонованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела подвергают соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хоть и получены из и связанные с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, в естественных условиях могут не существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Как применяется в данном документе, термин «переменный домен» (переменный домен легкой цепи (VL), переменная область тяжелой цепи (VH)) обозначает каждую из пар легкой и тяжелой цепей, которая непосредственно участвует в связывании антитела. Переменные домены легкой и тяжелой цепей человека имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных (FR) области, последовательности которых являются весьма консервативными, соединенные тремя «гиперпеременными областями» (или областями, определяющими комплементарность, CDR). Каркасные области принимают конформацию β -листа, и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру β -листа. CDR в каждой цепи удерживаются в их трехмерной структуре каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи образуют сайт связывания. Области CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антител и, следовательно, представляют собой дополнительный объект изобретения. «Связывающая часть, содержащая область VH и область VL» означает, что данные области являются соответствующими областями VH и VL указанной части, связывающей ВСМА или CD3.

Термины «гиперпеременная область» или «связывающая мишень часть антитела», когда применяются в данном документе, относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание мишени. Гиперпеременная область содержит аминокислотные остатки из «областей, определяющих комплементарность» или «CDR». «Каркасные» или «FR» области представляют

собой такие области переменных доменов, которые не являются остатками гиперпеременной области, как определено в данном документе. Следовательно, легкая и тяжелая цепи антитела содержат от N- до C-конца домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на каждой цепи разделены такими каркасными аминокислотами. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляет собой область, которая в наибольшей степени способствует связыванию с мишенью. Области CDR и FR определяют в соответствии со стандартным обозначением Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Как применяется в данном документе, термины «CDR1H, CDR2H и CDR3H» относятся к соответствующим CDR тяжелой цепи, расположенным в переменном домене VH. Как применяется в данном документе, термины «CDR1L, CDR2L и CDR3L» относятся к соответствующим CDR легкой цепи, расположенным в переменном домене VL.

Константный домен тяжелой цепи CH1, которым заменяют домен тяжелой цепи CH3, может относиться к любому классу Ig (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Константный домен CL легкой цепи, которым заменяют домен CH3 тяжелой цепи, может быть типа лямбда (λ) или каппа (κ), предпочтительно типа каппа (κ).

Как применяется в данном документе, термин «мишень» или «молекула-мишень» используются взаимозаменяемо и относятся к ВСМА человека. В отношении биспецифичных антител данный термин относится к ВСМА и второй мишени. Предпочтительно в отношении биспецифичных антител данный термин относится к ВСМА и CD3.

Термин «эпитоп» включает в себя любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления, детерминанта эпитопа включает в себя химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорил или сульфонил, и, в некоторых вариантах, может иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область мишени, с которой связывается антитело.

В целом, как правило, есть два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела. Что касается биспецифичного антитела, то есть два вектора, кодирующие

легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающиеся с первой мишенью, и еще два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающиеся со второй мишенью. Один из двух векторов кодирует соответствующую легкую цепь, а другой из двух векторов кодирует соответствующую тяжелую цепь. Однако в альтернативном способе приготовления антитела только один первый вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающиеся с первой мишенью, и только один второй вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающиеся с второй мишенью может быть использована для трансформации клетки-хозяина.

Предполагается, что термин «нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты», как применяется в данном документе, включает в себя молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

Как применяется в данном документе, выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают в себя потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают в себя первичную клетку изобретения и полученные из нее культуры без учета количества переносов. Также понятно, что все потомство может не быть полностью идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. Включены варианты потомства, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, для которой проводили скрининг в первоначально трансформированной клетке. Там, где подразумеваются разные обозначения, это будет ясно из контекста.

Как применяется в данном документе, термин «трансформация» относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев используются клетки без труднопреодолимых барьеров в виде клеточной стенки, то, например, проводится трансфекция способом осаждения фосфатом кальция, как описано Graham and Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Однако также могут быть использованы другие способы введения ДНК в клетки, такие как инъекция в ядро или слияние протопластов. Если используются прокариотические клетки или клетки, которые содержат прочные конструкции в виде

клеточной стенки, например, одним из способов трансфекции является обработка кальцием с использованием хлорида кальция, как описано Cohen SN, et al, PNAS 1972, 69 (8): 2110-2114.

Продуцирование рекомбинантных антител с использованием трансформации хорошо известно в данной области техники и описано, например, в обзорных статьях Makrides, S. C, Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, RJ., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880 а также в US6331415 и US4816567.

Как применяется в данном документе, термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого нуклеиновая кислота транскрибируется в мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК (также называемая транскриптом) впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды вместе называют генным продуктом. Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия в эукариотической клетке может включать в себя сплайсинг мРНК.

«Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности, самореплицирующуюся, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в и/или между клетками-хозяевами. Термин включает в себя векторы, которые функционируют главным образом для встраивания ДНК или РНК в клетку (например, хромосомной интеграции), репликации векторов, которые функционируют, главным образом, для репликации ДНК или РНК, и векторов экспрессии, которые функционируют для транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также включены векторы, которые обеспечивают больше чем одну из описанных функций.

«Вектор экспрессии» представляет собой полинуклеотид, который при введении в подходящую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. «Система экспрессии» обычно относится к подходящей клетке-хозяину, состоящей из вектора экспрессии, который может функционировать, чтобы давать выход желаемого продукта экспрессии.

Антитела предпочтительно получают рекомбинантными способами. Такие способы широко известны в данной области техники и включают в себя экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением

полипептида антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, встраивают в векторы экспрессии с помощью стандартных способов. Экспрессия выполняется в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, таких как клетки CHO, клетки NSO, клетки SP2/0, клетки HEK293, клетки COS, дрожжи или клетки *E. coli*, и антитело выделяют из клеток (супернатанта или клеток после лизиса). Биспецифичные антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Очистка выполняется для удаления других клеточных компонентов или других загрязнений, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков с помощью стандартных методов, включая щелочную/SDS обработку, колоночную хроматографию и другие, хорошо известные в данной области техники. Смотрите Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing и Wiley Interscience, New York (1987).

Экспрессия в клетках NSO описывается, например, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; и Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Временная экспрессия описывается, например, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Клонирование переменных доменов описывается Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; и Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Предпочтительная система временной экспрессии (HEK293) описывается Schlaeger, E.-J., и Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 и Schlaeger, E.-J., в *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Например, контрольные последовательности, которые подходят для прокариот, включают в себя промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Антитела подходящим способом отделяют от культуральной среды с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК или РНК, кодирующая моноклональные антитела,

легко выделяется и сиквенируется с использованием обычных процедур. Клетки гибридомы могут служить источником такой ДНК и РНК. После выделения, ДНК может быть встроена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки НЕК293, клетки CHO или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы достичь синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты аминокислотной последовательности (или мутанты) антитела получают путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или путем нуклеотидного синтеза. Такие модификации могут быть выполнены, однако, только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не изменяют вышеупомянутые характеристики антител, такие как изотип IgG и связывание с мишенью, но могут улучшать выход рекомбинантного продукта, стабильность белка или облегчать очистку.

В одном варианте осуществления изобретения, вместо биспецифичного антитела используют химерный рецептор антигена (CAR), при этом CAR содержит антиген-связывающий фрагмент, направленный против BCMA, трансмембранный фрагмент и фрагмент активации Т-лимфоцитов, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой антитело согласно данному изобретению (в данном случае не биспецифичное антитело). Затем такой CAR обычно переносят с использованием вектора, предпочтительно ретровирусного вектора, содержащего последовательность, кодирующую указанный CAR, в иммунную эффекторную клетку, для которой в данном документе используется термин «CAR Т-лимфоцит». Такие CAR Т-лимфоциты затем используют в комбинации с указанным иммунотерапевтическим лекарственным средством.

Кодируемое антитело также может представлять собой его антиген-связывающий фрагмент, как указано. Структуры и создание таких «CAR BCMA» описаны, например, в WO2013154760, WO2015052538, WO2015090229 и WO2015092024.

В одном варианте осуществления, вместо биспецифичного антитела используется химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит, содержащий:

- (i) фрагмент распознавания В-клеточного антигена созревания (BCMA);
- (ii) спейсерный домен; и

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) внутриклеточный сигнальный домен Т-лимфоцитов,

характеризующийся тем, что фрагмент распознавания BCMA представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO:17 и область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

а) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

б) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26,

с) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,

д) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32,

е) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32, и

ф) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32.

Фрагмент активации Т-лимфоцитов может представлять собой любой подходящий фрагмент, полученный или добытый из любой подходящей молекулы. В одном варианте осуществления, например, фрагмент активации Т-лимфоцитов содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен может представлять собой любой трансмембранный домен, полученный или добытый из любой молекулы, известной в данной области техники. Например, трансмембранный домен может быть получен или добыт из молекулы CD8α или молекулы CD28. CD8 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который служит корецептором рецептора Т-лимфоцита (TCR) и экспрессируется преимущественно на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Наиболее распространенная форма CD8 существует в виде димера, состоящего из альфа-цепи CD8 и бета-цепи CD8. CD28 экспрессируется на Т-лимфоцитах и обеспечивает костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-лимфоцитов. CD28 является рецептором для CD80

(B7.1) и CD86 (B7.2). В предпочтительном варианте осуществления, CD8 альфа и CD28 являются человеческими. В дополнение к трансмембранному домену, фрагмент активации Т-лимфоцитов дополнительно содержит внутриклеточный (т. е. цитоплазматический) сигнальный домен Т-лимфоцитов. Межклеточный сигнальный домен Т-лимфоцита может быть получен или добыт из молекулы CD28, молекулы дзета CD3 или ее модифицированных вариантов, гамма-цепи человеческого Fc-рецептора (FcR γ), молекулы CD27, молекулы OX40, молекулы 4-1BB, или других внутриклеточных сигнальных молекул, известных в данной области техники. Как обсуждалось выше, CD28 является маркером Т-лимфоцитов, важным для активации Т-лимфоцитов. Дзета CD3, объединяется с TCR для продуцирования сигнала и содержит иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина (ITAM). 4-1BB, также известный как CD137, передает мощный активирующий сигнал Т-лимфоцитам, способствуя дифференциации и увеличивая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. В одном варианте осуществления, CD28, дзета CD3, 4-1BB, OX40 и CD27 являются человеческими.

Такой CAR или соответствующий CAR Т-лимфоцитов существует совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, описанным в данном документе, для применения

- a) в комбинированном применении в лечении множественной миеломы согласно изобретению,
- b) в способе лечения множественной миеломы согласно изобретению,
- c) в терапевтической комбинации для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, согласно изобретению,
- d) в изделии согласно изобретению, и
- e) в способе изготовления лекарственного средства согласно изобретению.

Биспецифичные связыватели Т-лимфоцитов (ТСВ) обладают очень высокой, зависимой от концентрации/заполненности рецепторов опухолевых клеток активностью в отношении уничтожения клеток (например EC₅₀ при *in vitro* уничтожении клеток определяется в суб- или более низком пиколярном диапазоне; Dreier et al. Int J Cancer 2002), биспецифичные связыватели Т-лимфоцитов (ТСВ) предоставляют в значительно более низких дозах чем обычные

моноспецифичные антитела. Например, блинатумомаб (CD19хCD3) вводят непрерывной внутривенной дозой от 5 до 15 мкг/м²/сутки (т. е. только от 0,35 до 0,105 мг/м²/неделя) для лечения острого лимфолейкоза, или 60 мкг/м²/сутки для лечения неходжкинской лимфомы, и сывороточные концентрации при таких дозах находятся в диапазоне от 0,5 до 4 нг/мл (Klinger et al., Blood 2012; Topp et al., J Clin Oncol 2011; Goebeler et al. Ann Oncol 2011). Поскольку низкие дозы ТСВ могут проявлять высокую эффективность у пациентов, предусматривается, что в клинических условиях подкожное введение для биспецифичного антитела и лекарственного средства является возможным и предпочтительным (предпочтительно в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно 25 мг/м²/неделя, предпочтительно 250 мг/м²/неделя). Даже при таких низких концентрациях/дозах/заполненности рецепторов, ТСВ может вызывать значительные побочные эффекты (Klinger et al., Blood 2012). Поэтому очень важно контролировать заполненность/охват опухолевых клеток. У пациентов с высокими и изменчивыми уровнями сывороточных APRIL и BAFF (например, у пациентов с множественной миеломой, Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157) количество ТСВ, связанного с опухолевыми клетками, что соответствует заполненности опухолевых клеток, может значительно зависеть от APRIL/BAFF. Но при использовании указанного антитела, применяемого в данном изобретении, заполненность опухолевых клеток относительно эффективности/безопасности, может не потребоваться увеличение дозы для антитела согласно данному изобретению, поскольку на указанное антитело может не влиять конкуренция с лигандами APRIL/BAFF. Другое преимущество биспецифичного антитела основано на включении части Fc, которая увеличивает период полужизни до около 4-12 дней, и делает возможным введения по меньшей мере один или два раза в неделю, по сравнению с ТСВ без части Fc (например, блинатумомаб), которые необходимо выполнять внутривенно и непрерывно с помощью насоса, носимого пациентами. Биологические свойства биспецифичных антител были исследованы в нескольких исследованиях в сравнении с 83A10-ТСВсв. Эффективность индуцирования перенаправленной цитотоксичности Т-лимфоцитов, например, анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антителами 21-ТСВсв, 22-ТСВсв, 42-ТСВсв по сравнению с 83A10-ТСВсв оценивали на клеточной линии H929 MM (Пример 8, Таблица 12, Фиг. 4). Были исследованы антитела, использованные в данном изобретении, и анализ показал,

что значения EC50, выражающие зависимость от концентрации уничтожения клеток H929, были выше чем значения EC50, определенные для 83A10-TCVsv; это предполагает, что биспецифичные антитела были менее эффективными в индукции уничтожения клеток H929 MM, чем Mab 83A10 в качестве TCB. Удивительно, но наблюдалась обратная ситуация, когда перенаправленную цитотоксичность Т-лимфоцитов определяли на клеточной линии RPMI-8226 MM, а также на клеточной линии JJN-3 (соответственно, Примеры 10 и 11, Таблицы 13, 14 и 15, Фиг. 6 и 7): биспецифичные антитела показали более низкое EC50 и, следовательно, более высокую активность, чем 83A10-TCVsv. К удивлению изобретателей, биспецифичные антитела показали несколько преимуществ в прямом сравнении с 83A10 TCVsv в аспиратах костного мозга, свежееотобранных у пациентов с MM (примечание: чтобы получить наилучшее возможное сравнение, во всех аспиратах костного мозга всегда все биспецифичные Т-лимфоцитарные (TCB) антитела тестировали в одинаковых концентрациях);

- Более высокая эффективность уничтожения миеломных клеток, то есть тот же % уничтожения уже при более низких концентрациях, чем с 83A10-TCVsv, соответственно, кривые зависимости концентрации для уничтожения смещены влево (Пример 13, Таблицы 18, 19 и 20, Фиг. 8, 9 и 10). Снижение составляло от 77,1 до 100% уже при концентрации 1 нМ биспецифичных антител в аспиратах костного мозга семи разных пациентов, по сравнению с контролем в виде отрицательных по пропидий йодиду жизнеспособных раковых клеток множественной миеломы. При использовании 1 нМ 83A10-TCVsv в тех же семи аспиратах костного мозга было достигнуто снижение только на 37,1–98,3% (Таблицы 20 и 21).

- Более высокое максимальное уничтожение по сравнению с 83A10-TCVsv было достигнуто при самой высокой протестированной концентрации (10 нМ) в том же эксперименте с семью (7) аспиратами костного мозга для биспецифичных антител (Таблицы 20 и 21).

- Не отвечающие на действие 83A10-TCVsv могут быть обращены в отвечающие, если применяют 22-TCVsv/42-TCVsv: в образцах костного мозга двух (2) пациентов, у которых не наблюдали уничтожение в ответ на 83A10-TCVsv, неожиданно было обнаружено уничтожение с антителами в виде TCB согласно изобретению (Фиг. 9A и 9B).

ТСВ ВСМАхCD3, используемый в данном изобретении, связывается с ВСМА человека и яванских макак, а также с ВСМА мышей и крыс, является подходящим для токсикологического исследования на яванских макаках, если связыватель CD3 также связывается с CD3 яванского макак, или на мышах/крысах, если связыватель CD3 также связывается с ВСМА мыши/крысы. Удивительно, но аффинность связывания с ВСМА яванского макака очень близка к аффинности связывания с ВСМА человека. SPR применяли для измерения аффинности связывания с ВСМА человека и яванского макак (Пример 2, Таблица 4). Различие яванский макак/человек (соотношение аффинности для яванского макака к таковой человека для ВСМА, КД) рассчитывали по данным измеренной аффинности путем деления аффинности к ВСМА яванского макака на аффинность к ВСМА человека (Пример 3, Таблица 5). Для 83A10 было обнаружено различие яванский макак/человек, составляющее 15,3 (то есть в 15,3 раза более низкая аффинность связывания с ВСМА яванского макак, чем с таковым человека). К удивлению изобретателей, биспецифичные антитела показали различие яванский макак/человек между 15,4 и 1,7, что является сходным или в большинстве случаев более предпочтительным различием яванский макак/человек, чем таковое у 83A10 (Таблица 5). Поскольку связыватель CD3, используемый в ТСВ ВСМАхCD3, является перекрестно-реактивным с CD3 яванского макака, исследования фармакокинетики и фармакодинамики могут быть получены на яванских макаках (смотрите Пример 16). Также токсикологические исследования на яванских макаках позволяют прогнозировать фармакологические и токсикологические эффекты у людей, а особенность в виде перекрестной реактивности с яванскими макаками является преимуществом для пациентов. Антитела к ВСМА, используемые в данном изобретении, также связываются с мышинным ВСМА (например, Кот клонов 22 и 42, измеренная с помощью SPR - 0,9 нМ и 2,5 нМ), смотрите Таблицу 2D в Примере 1.1.1A.4). Связыватель CD3 ТСВ ВСМАхCD3 не является перекрестно-реактивным по отношению к CD3 мыши.

Таким образом, преимущества по эффективности и активности в уничтожении линий клеток ММ с низкой экспрессией ВСМА, таких как RPMI-8226 и JJN-3, и особенно в уничтожении клеток ММ в аспиратах костного мозга пациентов, и, кроме того, очень подходяще различие яванский макак/человек в аффинности связывания с ВСМА,

делают антитела, используемые в данном изобретении, и соответствующие ТСВ по существу перспективными агентами для лечения пациентов с ММ. Кроме того, анти-BCMAxCD3 TCB_{sv}, используемый в данном изобретении, имеет как и 83A10-TCB_{sv}, подходящие свойства, такие как длительный период полужизни, эффективность при введении один раз в неделю (внутривенно, подкожно), низкую или отсутствующую тенденцию к агрегации, и может быть изготовлен с высокой чистотой и хорошим выходом.

Таблица 1А: Последовательности антител

SEQ ID NO:	Название(ния)	аминокислотные последовательности
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWW
7	CD3 VH	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWWSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWWQEKPGQA FRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL
9	83A10 VH	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QG TKVEIK
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSEYYL AWYQQKPGQAPRL LIEHA STRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG

	Mab39 VL	QGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYYL AWYQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSDEYL SWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFDY
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLAW
19	83A10 CDR2L	YGASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPDFTF
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT

25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLAW
26	Mab22 CDR2L	SGAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLSW
28	Mab42 CDR2L	HSASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAP MGWWRQAPGKGLEWWSAISYIGHTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLG WFDYWGQGTLVTVSS
39	Mab33 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNA MGWWRQAPGKGLEWWSAINRFGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNA MGWWRQAPGKGLEWWSAISPTGFSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSS
41	83A10 BCMA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFP

	CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPK SC
42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
45	83A10 HC с «выступом»	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ AVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGKKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWWFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

		TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
46	83A10 HC с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS SGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVW CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWWSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV

		RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSASVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
49	Mab21 HC с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ AVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWWFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
50	Mab21 HC с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC

		NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYL AWYQQKPGQAPRLIEHASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASV CLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
52	Mab22 HC с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ AVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGKKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ

		PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
53	Mab22 HC с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYL AWYQQKPGQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKIDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
55	Mab42 HC с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ

		AVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWWFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
56	Mab42 HC с «отверстием»	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYL SWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASV

		CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
--	--	--

Примечание: SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:33 идентичны

Таблица 1В: Последовательности антител (короткий перечень)

	SEQ ID NO:							
антитело к CD3	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3 L
	7	8	1	2	3	4	5	6
антитело к BCMA	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3 L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33

Таблица 2А: Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:			
Фрагмент/Конструкция	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

Таблица 2В: Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:			
Конструкция	83A10	Mab21	Mab22	Mab4 2
BCMA VH_CH1 _{cv} x CD3 VL_CH1 Fc «выступ» LALA PG (HC с «выступом»)	45	49	52	55
BCMA _{cv} HC «отверстие» LALA PG (HC с «отверстием»)	46	50	53	56
BCMA _{cv} чел. IgG1 LC (BCMA LC)	47	51	54	57

CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48
--------------------	----	----	----	----

Чтобы получить следующие (2+1) Fc-содержащие анти-BCMA/анти-CD3 TCB, использовали соответствующие конструкции/идентификаторы последовательностей, как указано в Таблице 2B выше:

83A10-TCBcv: 45, 46, 47 (x2), 48 (Фиг. 2A)

21-TCBcv: 48, 49, 50, 51 (x2) (Фиг. 2A)

22-TCBcv: 48, 52, 53, 54 (x2) (Фиг. 2A)

42-TCBcv: 48, 55, 56, 57 (x2) (Фиг. 2A)

В дополнительных конкретных вариантах осуществления изобретения перечислены:

I. Биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

II. Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, согласно варианту осуществления I, характеризующееся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

III. Способ лечения множественной миеломы, характеризующийся введением пациенту, нуждающемуся в таком лечении

а) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

IV. Способ согласно варианту осуществления III, характеризующийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаб, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

V. Терапевтическая комбинация для достижения лизиса клетки множественной миеломы у пациента, страдающего множественной миеломой, характеризующаяся тем, что содержит

а) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

VI. Терапевтическая комбинация согласно варианту осуществления V, характеризующаяся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

VII. Изделие, характеризующееся тем, что содержит

a) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть

содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28 в фармацевтически приемлемом носителе,

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

с) фармацевтически приемлемый носитель и инструкции для введения указанного биспецифичного антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

VIII. Изделие согласно варианту осуществления VII, характеризующееся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

IX. Способ изготовления лекарственного средства, характеризующийся тем, что используют

a) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

с) объединяя указанное биспецифичное антитело и указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство в фармацевтически приемлемом носителе.

Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Х. Способ изготовления лекарственного средства согласно варианту осуществления IX, характеризующийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

Ниже перечислены конкретные варианты осуществления первой связывающей части согласно изобретению:

1. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO:17 и область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы
 - a) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
 - b) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26,
 - c) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,
 - d) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32,
 - e) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32, и
 - f) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32.
2. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- a) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
 - b) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
 - c) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.
3. Антитело согласно варианту осуществления 1 или 2, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VL область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14.
4. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12.
5. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO:13.
6. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO:14.
7. Антитело согласно варианту осуществления 1 или 2, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).
8. Антитело согласно варианту осуществления 7, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).
9. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO:31, область CDR2L SEQ ID NO:32 и область CDR3L SEQ ID NO:20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы
- a) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30,
 - b) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, или
 - c) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37.
10. Антитело согласно варианту осуществления 9, характеризующееся тем, что содержит область VL SEQ ID NO:12 и область VH, выбранную из группы, содержащую области VH SEQ ID NO:38, 39 и 40.

11. Антитело согласно варианту осуществления 9 или 10, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).

12. Антитело согласно варианту осуществления 9 или 10, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

13. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-12, характеризующееся тем, что оно также специфически связывается с BCMA яванского макака и содержит дополнительный фрагмент Fab, специфически связывающийся с CD3ε.

14. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-13, характеризующееся тем, что оно является антителом с частью Fc или без части Fc. Ниже перечислены конкретные варианты осуществления биспецифического антитела согласно изобретению:

15. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с BCMA и CD3ε, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO:17 и область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

a) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

b) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26,

c) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,

d) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32,

e) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32, и

f) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32.

16. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен BCMA человека (далее также называемый «BCMA») и CD3ε человека (далее также называемый «CD3»),

характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- а) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- б) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- с) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

17. Биспецифичное антитело согласно варианту осуществления 15 или 16, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO:10.

18. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-16, характеризующееся тем, что VL BCMA выбирают из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO:12, 13 и 14.

19. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 14-18, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH BCMA область VH SEQ ID NO:10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO:12, или в качестве VH BCMA область VH SEQ ID NO:10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO:13, или в качестве VH BCMA область VH SEQ ID NO:10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO:14.

20. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15 или 19, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S), и гистидин (H).

21. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-20, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

22. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с BCMA и CD3, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO:31, область CDR2L SEQ ID NO:32 и область CDR3L SEQ ID NO:20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- а) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30,
- б) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, или

с) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37.

23. Биспецифичное антитело согласно варианту осуществления 22, характеризующееся тем, что содержит область VL SEQ ID NO:12 и область VH, выбранную из группы, включающую в себя области VH SEQ ID NO:38, 39 и 40.

24. Биспецифичное антитело согласно варианту осуществления 22 или 23, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S), и гистидин (H).

25. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 22-24, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

26. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-25, характеризующееся тем, что содержит анти-BCMA антитело согласно изобретению и анти-CD3 антитело, в котором

а) легкая цепь и тяжелая цепь антитела согласно любому варианту осуществления 1-7; и

б) легкая цепь и тяжелая цепь антитела специфически связываются с CD3, при этом переменные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1 заменяют друг другом.

27. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-26, характеризующееся тем, что содержит не большее чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab части анти-BCMA антитела, и не больше чем одну часть Fc.

28. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-27, характеризующееся тем, что содержит часть Fc, соединенную ее N-концом с C-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3 и с C-концом одного из указанных фрагментов Fab антитела к BCMA.

29. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-28, характеризующееся тем, что содержит второй фрагмент Fab указанного анти-BCMA антитела (часть антитела к BCMA), соединенный его C-концом с N-концом указанного фрагмента Fab указанного анти-CD3 антитела (часть антитела к CD3) указанного биспецифичного антитела.

30. Биспецифичное антитело согласно варианту осуществления 29, характеризующееся тем, что домен VL указанного фрагмента Fab анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 указанного второго фрагмента Fab анти-BCMA антитела.

31. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-30, характеризующееся тем, что переменный домен VH части анти-CD3 антитела (далее называемый «VH CD3») содержит CDR SEQ ID NO:1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменный домен VL части анти-CD3 антитела (далее называемый «VL CD3»), содержит CDR SEQ ID NO:4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

32. Биспецифичное антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-31, характеризующееся тем, что переменные домены части анти-CD3ε антитела представляют собой SEQ ID NO:7 и 8.

33. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен BCMA человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела по любому из пп. 1-7; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и

с) при этом в константном домене CL первой легкой цепи а) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 первой тяжелой цепи а) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, Фиг. 1А, 2А, 2С, 3А, 3С).

34. Биспецифичное антитело конкретно по п. 33, характеризующееся тем, что в дополнение содержит фрагмент Fab указанного первого антитела (далее называемый также «BCMA-Fab») и в константном домене CL указанного BCMA-Fab

аминокислоту в позиции 124 замещают независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 указанного ВСМА-Fab аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, Фиг. 2А, 2С).

35. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела по любому из пп. 1-7; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH в второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и при этом

с) в константном домене CL второй легкой цепи а) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 второй тяжелой цепи б) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата).

36. Биспецифичное антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит набор тяжелых и легких цепей, выбранный из группы, состоящей из полипептидов

i) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, и SEQ ID NO:51 (2х); (набор 1 TCB антитела 21),

ii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, и SEQ ID NO:54 (2х) (набор 2 TCB антитела 22), и

iii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, и SEQ ID NO:57 (2х) (набор 3 TCB антитела 42).

37. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит, содержащий: фрагмент распознавания антигена, направленный против ВСМА и фрагмента активации Т-лимфоцитов, характеризующийся тем, что фрагмент

распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело или фрагмент антитела согласно любому из вариантов осуществления 1-14.

38. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит согласно варианту осуществления 37, характеризующийся тем, что содержит:

- (i) фрагмент распознавания В-клеточного антигена созревания (BCMA);
- (ii) спейсерный домен; и
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен Т-лимфоцитов,

39. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит согласно варианту осуществления 37 или 38, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело или фрагмент антитела, специфически связывающийся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO:17 и область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- a) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- b) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26,
- c) область CDR1H SEQ ID NO:21 и область CDR2H SEQ ID NO:22, область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,
- d) область CDR1H SEQ ID NO:29 и область CDR2H SEQ ID NO:30, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32,
- e) область CDR1H SEQ ID NO:34 и область CDR2H SEQ ID NO:35, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32, и
- f) область CDR1H SEQ ID NO:36 и область CDR2H SEQ ID NO:37, область CDR1L SEQ ID NO:31, и область CDR2L SEQ ID NO:32.

В одном варианте осуществления, связывание биспецифичного антитела не снижается 100 нг/мл APRIL больше чем на 20%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 405 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим BCMA без APRIL, указанное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только APRIL, и указанное антитело не

изменяет активацию NF-κB без APRIL больше чем на 20% по сравнению с случаем без указанного антитела.

В одном варианте осуществления, связывание биспецифичного антитела в концентрации 6,25 нМ не снижает 140 нг/мл APRIL больше чем на 10%, предпочтительно не снижается больше чем на 1%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 450 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим BCMA без APRIL. Связывание указанного антитела в концентрации 50 нМ не снижает 140 нг/мл APRIL мыши больше чем на 10%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 450 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим BCMA без APRIL.

В одном варианте осуществления, связывание указанного антитела не снижает 100 нг/мл APRIL и не снижает 100 нг/мл BAFF больше чем на 20%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 405 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим BCMA без APRIL или BAFF соответственно, антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только APRIL, не изменяет BAFF-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только BAFF, и не изменяет активацию NF-κB без BAFF и APRIL больше чем на 20% по сравнению с случаем без указанного антитела.

В одном варианте осуществления, связывание указанного антитела с BCMA человека не снижает 100 нг/мл APRIL больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА, не снижается 1000 нг/мл APRIL больше чем на 20%, как измерено в указанном ИФА, и не снижается 1000 нг/мл APRIL больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА.

В одном варианте осуществления, связывание указанного антитела с BCMA человека не снижает 100 нг/мл APRIL и не снижает 100 нг/мл BAFF больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА, не снижается 1000 нг/мл APRIL и не снижается 1000 нг/мл BAFF больше чем на 20%, как измерено в указанном ИФА, и не снижается 1000 нг/мл APRIL и не снижается 1000 нг/мл BAFF больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА.

В одном варианте осуществления, биспецифичное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 15%, не изменяет BAFF-зависимую

активацию NF- κ B больше чем на 15% и не изменяет NF- κ B активацию без APRIL и BAFF больше чем на 15%.

В одном варианте осуществления, связывание антитела с BCMA не снижается APRIL, не снижается BAFF больше чем на 25%, больше чем на 20% и больше чем на 10%, как измерено по связыванию указанного антитела в концентрации 5 нМ, предпочтительно 50 нМ и 140 нМ, с клетками NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) в присутствии или в отсутствие APRIL или соответственно BAFF в концентрации 2,5 мкг/мл по сравнению со связыванием указанного антитела с клетками NCI-H929 в отсутствие APRIL или BAFF соответственно.

В одном варианте осуществления, нижеследующие примеры, перечень последовательностей и фигуры предоставлены для того, чтобы помочь понять данное изобретение, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Понятно то, что могут быть внесены модификации в изложенные процедуры без отклонения от сущности изобретения.

Материалы и общие способы

Способы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК применяли стандартные способы, как описано в Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-биологические реагенты использовали в соответствии с инструкциями производителя. Общая информация о нуклеотидных последовательностях легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов человека приведена в: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242. Аминокислоты цепей антител были пронумерованы и обозначены согласно Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Синтез генов

а) Желаемые генные сегменты получали из олигонуклеотидов, произведенных химическим синтезом. Генные сегменты длиной 600-1800 п.н., которые были фланкированы единичными сайтами расщепления эндонуклеазами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая амплификацию ПЦР, и затем клонировали с помощью указанных сайтов рестрикции, например,

KpnI/Sad или AscI/PacI в клонирующий вектор pGA4 на основе pPCRScript (Stratagene). Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали сиквенированием ДНК. Синтезированные генные фрагменты были упорядочены в соответствии с предоставленными инструкциями Geneart (Регенсбург, Германия).

б) желаемые генные сегменты, когда это было необходимо, либо создавались с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо были синтезированы Geneart AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и продуктов ПЦР с помощью автоматического синтеза генов. Генные сегменты, фланкированные единичными сайтами расщепления эндонуклеазой рестрикции, были клонированы в стандартные векторы экспрессии или в векторы для сиквенирования, для дополнительного анализа. Плазмидную ДНК очищали от трансформированных бактерий с использованием коммерчески доступных наборов для очистки плазмид. Концентрацию плазмид определяли с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов гена была подтверждена сиквенированием ДНК. Генные сегменты конструировали с подходящими сайтами рестрикции, чтобы сделать возможным субклонирование в соответствующие векторы экспрессии. При необходимости, гены, кодирующие белки, конструировали с использованием 5'-концевой последовательности ДНК, кодирующей лидерный пептид, способствующий секреции белков в эукариотических клетках.

Определение последовательности ДНК

Последовательности ДНК определяли путем двухцепочечного сиквенирования.

Анализ последовательности ДНК и белка, и обращение с данными последовательностей

Пакет программного обеспечения Clone Manager (Scientific & Educational Software) версии 9.2 использовался для картирования последовательности, анализа, аннотирования и иллюстрации.

Векторы экспрессии

а) Гибридные гены, содержащие описанные цепи антител, как описано ниже, получали с помощью ПЦР и/или генного синтеза, и собирали с помощью известных рекомбинантных способов и методов путем соединения соответствующих

нуклеотидных сегментов, например, используя уникальные сайты рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности проверяли сиквенированием ДНК. Для временной трансфекции большие количества плазмид получают приготовлением плазмиды из трансформированных культур *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

б) Для создания векторов экспрессии анти-BCMA антитела, вариабельные области последовательностей ДНК тяжелой и легкой цепей субклонировали в рамку считывания либо с константной областью тяжелой цепи IgG1 человека, либо с константной областью легкой цепи IgG1 человека, предварительно вставленную в соответствующий обычный принимающий вектор экспрессии, оптимизированный для экспрессии в клеточных линиях млекопитающих. Экспрессия антитела управляется химерным промотором MPSV, содержащим энхансер ЦМВ и промотор MPSV, за которым следуют 5'-UTR, интрон и элемент MAR каппа Ig. Транскрипция заканчивается синтетической polyA сигнальной последовательностью на 3'-конце CDS. Все векторы несут 5'-концевую последовательность ДНК, кодирующую лидерный пептид, способствующий секреции белков в эукариотических клетках. Кроме того, каждый вектор содержит последовательность EBP OriP для репликации эписомальных плазмид в клетках EBNA, экспрессирующих EBV.

с) Для получения векторов биспецифичных антител BCMAxCD3 биспецифичные молекулы, полученные из IgG1, состоят, по меньшей мере, из двух антиген-связывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами CD3 и BCMA. Антиген-связывающие фрагменты представляют собой фрагменты Fab, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая из которых содержит вариабельную и константную области. По меньшей мере, один из фрагментов Fab представлял собой фрагмент «Crossfab», в котором VH и VL были заменены. Обмен VH и VL внутри фрагмента Fab гарантирует, что фрагменты Fab различной специфичности не имеют идентичного расположения доменов. Конструкция биспецифичной молекулы была моновалентной для CD3 и бивалентной для BCMA, где один фрагмент Fab был слит с N-концом внутренней части CrossFab (2+1). Биспецифичная молекула содержала часть Fc, чтобы молекула имела длительный период полужизни. Схематическое представление конструкций приведено в Фиг. 2; предпочтительные последовательности

конструкций показаны в SEQ ID NO:39-52. Молекулы были получены путем ко-трансфекции клеток HEK293 EBNA, растущих в суспензии, экспрессирующими векторами млекопитающих, с использованием раствора на основе полимера. Для приготовления конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими векторами экспрессии в соотношении 1:2:1:1 («вектор Fc (выступ)»: «вектор легкой цепи»: «вектор легкой цепи CrossFab» : «вектор тяжелой цепи CrossFab»).

Методы культивирования клеток

Стандартные методы культивирования клеток применяли, как описано в Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. и Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Временная экспрессия в клетках HEK293 (система HEK293-EBNA)

Биспецифичные антитела экспрессировали с помощью временной ко-трансфекции соответствующими экспрессирующими векторами млекопитающих клеток HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии с использованием раствора на основе полимера. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в количестве 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавлением 6 mM L-глутамина. Центрифугировали 2,0 млн. жизнеспособных клеток на каждый мл объема конечного продукта (5 минут при $210 \times g$). Аспирировали супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК на каждый мл объема конечного продукта готовили путем смешивания 1 мкг ДНК (соотношение тяжелая цепь: модифицированная тяжелая цепь: легкая цепь: модифицированная легкая цепь = 1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимера (1 мг/мл) смесь встряхивали в течение 15 секунд и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. Через 10 минут ресуспендированные клетки и смесь ДНК/раствор на основе полимера объединяли и затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали в встряхивающее устройство (37 °C, 5% CO₂). После 3 часов инкубации на каждый мл объема конечного продукта добавляли 800 мкл среды Ex-Cell, дополненной 6 mM L-глутамина, 1,25 mM вальпроевой кислоты и 12,5% Pepsoy (50 г/л). Через 24 часа на каждый мл конечного объема продукта добавляли 70 мкл питательного раствора. Через 7 дней, или когда жизнеспособность клеток составляла или была ниже 70%, клетки отделяли от

супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали с помощью этапа аффинного связывания и одного или двух этапов дополнительной очистки с использованием катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. При необходимости использовали дополнительный этап очистки. Рекомбинантное человеческое анти-BCMA антитело и биспецифичные антитела продуцировали в суспензии путем ко-трансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессирующими векторами млекопитающих с использованием раствора на основе полимера. Клетки трансфицировали двумя или четырьмя векторами, в зависимости от формы. Для IgG1 человека одна плазмида кодировала тяжелую цепь, а другая плазмида - легкую цепь. Для биспецифичных антител ко-трансфицировали четыре плазмиды. Две из них кодировали две различные тяжелые цепи, а две другие кодировали две различные легкие цепи. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в количестве 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду F17 с добавлением 6 mM L-глутамина.

Определение белка

Определение концентрации антител осуществляли путем измерения поглощения при 280 нм, используя теоретическое значение поглощения в 0,1% растворе антитела. Эта величина была основана на аминокислотной последовательности и рассчитана с помощью программного обеспечения GPMW (Lighthouse data).

ДСН-ПААГ электрофорез

Применяли систему NuPAGE® Pre-Cast gel (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. В частности, использовали 10% или 4-12% гели NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) и NuPAGE® MES (восстановленные гели с антиоксидантной добавкой NuPAGE® в рабочем буфере) или MOPS (невосстановленные гели) с рабочим буфером.

Очистка белка

Аффинной хроматографией с белком А

На этапе аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку с белком А (HiTrap Protein A FF, 5 мл, GE Healthcare), уравнивали 6 CV 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, pH 7,5. После этапа промывки тем же буфером антитело элюировали из колонки путем поэтапного элюирования 20 mM фосфатом натрия, 100 mM хлорида натрия, 100 mM глицином, pH 3,0. Фракции с желаемым

антителом немедленно нейтрализовали 0,5 М фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Катионообменной хроматографией

Для этапа катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 элюирующим буфером, используемым для этапа аффинного связывания, и загружали в катионообменную колонку (Poros 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки уравнивающим буфером и промывочным буфером, соответствующие 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM трис, pH 5,0 и 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM трис, 100 mM хлорида натрия, pH 5,0, белок элюировали с помощью градиента, используя 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM TRIS, 100 mM хлорида натрия, pH 8,5. Фракции, содержащие желаемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке на этапе эксклюзионной хроматографии.

Аналитической эксклюзионной хроматографией

Для этапа эксклюзионной хроматографии концентрированный белок вводили в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), с 20 mM гистидина, 140 mM хлорида натрия, pH 6,0 с или без Tween 20, в качестве состава буфера. Фракции, содержащие мономеры, объединяли, концентрировали центрифугированием и стерильно фильтровали в стерильный флакон.

Измерение чистоты и содержания мономера

Чистоту и содержание мономера в конечном белковом препарате определяли с помощью CE-SDS (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, колонка для аналитической эксклюзионной хроматографии (Tosoh)) в буфере 25 mM фосфата калия, 125 mM хлорида натрия, 200 mM моногидрохлорида L-аргинина, 0,02% (мас./об.) азида натрия, pH 6,7.

Подтверждение молекулярной массы с помощью анализов ЖХ-МС

Дегликозилирование

Для подтверждения гомогенного состояния препарата молекул конечный белковый раствор анализировали с помощью ЖХ-МС анализов. Для устранения гетерогенности, вносимой углеводами, конструкции обрабатывают PNGaseF (ProZyme). Поэтому pH раствора белка доводили до pH 7,0 путем добавления 2 мкл 2 М триса к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGaseF и инкубировали в течение 12 часов при 37 °С.

ЖХ-МС анализ - обнаружение в работающем режиме

Способ ЖХ-МС выполняли на ВЭЖХ Agilent 1200, соединенном с масс-спектрометром TOF 6441 (Agilent). Хроматографическое разделение проводили на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6 x 250 мм; кат. № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05% (об./об.) муравьиной кислоты в воде, элюент В представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40 °С и 6 мкг (15 мкл) образца белка, полученного обработкой, как описано выше.

Время (мин.)	%В
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

В течение первых 4 минут элюат направляли в отходы для защиты масс-спектрометра от солевого загрязнения. ESI-источник работал с потоком осушающего газа 12 л/мин, температурой 350 °С и давлением распылителя 60 фунтов на квадратный дюйм. Спектры МС получали с использованием напряжения фрагментатора 380 В и диапазоном масс от 700 до 3200 m/z в режиме положительных ионов. Данные МС были получены с помощью программного обеспечения прибора с 4 по 17 минуты.

Выделение человеческих МКПК из крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали путем центрифугирования с раствором Histopaque из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарных слоев), полученных из местных банков крови или из

свежей крови здоровых доноров-людей. Вкратце, кровь разводили стерильным ФСБ и осторожно наслаивали поверх градиента Histopaque (Sigma, H8889). После центрифугирования в течение 30 минут при 450 x g при комнатной температуре (торможение отключено) убирали часть плазмы над промежуточной фазой, содержащей МКПК. МКПК переносили в новые пробирки Falcon объемом 50 мл и пробирки заполняли ФСБ до общего объема 50 мл. Смесь центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 минут при 400 g (тормоз отключен). Супернатант удаляли и осадок МКПК дважды промывали стерильным ФСБ (этапы центрифугирования при 4 °C в течение 10 минут при 350 g). Полученную популяцию МКПК подсчитывали автоматически (ViCell) и хранили в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% L-аланил-L-глутамин (Biochrom, K0302) при 37 °C, 5% CO₂ в инкубаторе до начала анализа.

Выделение первичных МКПК яванского макака из гепаринизированной крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали путем центрифугирования в градиенте плотности из свежей крови здоровых доноров-яванских макаков, следующим образом: Гепаринизированную кровь разводили стерильным ФСБ 1:3, а среду Lymphoprep (Axon Lab кат. № 1114545) разводили до 90% стерильным ФСБ. Два объема разведенной крови наслаивали на один объем разбавленного градиента плотности и фракцию МКПК отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 520 x g без торможения при комнатной температуре. Шар МКПК переносили в чистую пробирку Falcon объемом 50 мл и промывали стерильным ФСБ путем центрифугирования в течение 10 минут при 400 g при 4 °C. Для удаления тромбоцитов выполняли одно низкоскоростное центрифугирование (15 минут при 150 x g, 4 °C), и полученную популяцию МКПК автоматически подсчитывали (ViCell) и сразу использовали в дальнейших анализах.

Примеры

Пример 1: Создание анти-ВСМА антител

Пример 1.1: Изготовление антигенов и рабочих реагентов

Пример 1.1.1: Рекомбинантный растворимый внеклеточный домен ВСМА человека

Внеклеточные домены ВСМА человека, яванского макака и мыши, которые использовались в качестве антигенов для отборов фаговым дисплеем, временно

экспрессировали в виде N-концевого мономерного Fc-гибрида в клетках HEK EBNA, и сайт-специфически биотинилировали *in vivo* путем ко-экспрессии с биотин-лигазой BirA, по avi-tag распознаваемой последовательности, расположенной на C-конце части Fc, несущей цепочку рецептора (цепь Fc с выступом). Внеклеточные домены ВСМА человека и яванского макака содержали последовательность с метионина 4 по аспарагин 53 и с метионина 4 по аспарагин 52, соответственно. Они были слиты через N-концы с шарнирной областью человеческого IgG1, делая возможной гетеродимеризацию с не слитой человеческой частью Fc IgG1 (цепь с отверстием) по технологии «выступы в отверстия».

Пример 1.1.1A: Создание анти-ВСМА антител путем созреваия

1.1.1A.1 Библиотеки и отборы

Были сконструированы две библиотеки на основе антитела 83A10. Данные библиотеки рандомизировали либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи (83A10 L1/L2), либо по CDR1 и CDR2 тяжелой цепи (83A10 H1/H2), соответственно. Каждая из этих библиотек была сконструирована с помощью 2 подряд этапов амплификации и сборки. Продукты окончательной сборки расщепляли NcoI/BsiWI для библиотеки 83A10 L1/L2, MunI и NheI для библиотеки 83A10 H1/H2, наряду с аналогично обработанными акцепторными векторами на основе плазмидных препаратов клона 83A10. Следующие количества расщепленных рандомизированных (частичных) V-доменов и расщепленного акцепторного вектора(ов) лигировали для соответствующих библиотек (мкг V-домена/мкг вектора): библиотеки a.m.83A10 L1/L2 (3/10), библиотеки 83A10 H1/H2 (3/10). Собирали очищенные лигаты библиотек 83A10 L1/L2 и 83A10 H1/H2, соответственно, и использовали для 15 трансформаций клеток TG1 *E. coli* для каждой из 2 библиотек, чтобы получить окончательные размеры библиотек, составляющие $2,44 \times 10^{10}$ для библиотеки 83A10 L1/L2, и $1,4 \times 10^{10}$ для библиотеки a.m.83A10 H1/H2. Фагмидные частицы, демонстрирующие данные библиотеки Fab, были выделены и очищены.

1.1.1A.2 Отбор клонов

Отборы проводили против эктодомена В-клеточного антигена созреваия (ВСМА) человека или яванского макака, к которому был клонирован выше по рамке считывания Fc и avi-тэг. Перед отборами истощающий Fc компонент наносили на

планшеты с нейтравидином в концентрации 500 нМ. Отборы проводились по следующей схеме:

1) связывание примерно 10^{12} фагмидных частиц библиотеки .83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 с иммобилизованным источяющим Fc компонентом в течение 1 ч, 2) перенос несвязанных фагмидных частиц библиотеки .83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 к 50 нМ, 25 нМ, 10 нМ, или 2 нМ ВСМА человека или яванского макака (в зависимости от библиотеки и раунда отбора) на 20 мин, 3) добавление магнитных стрептавидиновых гранул на 10 минут, 4) промывка магнитных стрептавидиновых гранул с использованием 10×1 мл ФСБ/Tween® 20 и 10×1 мл ФСБ, 5) элюирование фаговых частиц путем добавления 1 мл 100 мМ ТЕА (триэтиламин) в течение 10 мин и нейтрализация путем добавления 500 мкл 1М Tris®/HCl pH 7,4, и 6) повторное инфицирование клеток TG1 *E. coli* в лог-фазе, заражение вспомогательным фагом VCSM13 и последующее осаждение ПЭГ/NaCl фагмидных частиц для использования в последующих раундах отбора.

Отборы проводили в течение 3 раундов и условия были скорректированы в 5 оптимизирующих потоках для каждой из 2 библиотек по отдельности. Подробно параметры отбора представляли собой:

оптимизирующий поток 1 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА человека для раунда 3), оптимизирующий поток 2 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 10 нМ ВСМА человека для раунда 2, 2 нМ ВСМА человека для раунда 3), оптимизирующий поток 3 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА человека для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3), оптимизирующий поток 4 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3), оптимизирующий поток 5 (50 нМ ВСМА яванского макака для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3).

Тяжелые цепи антител Mab 21, Mab 22, Mab 33 и Mab 42 к ВСМА были получены в оптимизирующем потоке 5, в котором использовался только ВСМА яванского макака.

1.1.1A.3 Способ скрининга

Отдельные клоны экспрессировали бактериально в виде 1 мл культур в 96-луночном формате, и супернатанты подвергали скринингу с помощью ИФА. Конкретные связыватели определяли как сигналы, большие чем 5-кратный фон для ВСМА человека и яванского макака, и как сигналы, ниже чем 3-кратный фон для истощающих Fc элементов. Полосочные 96-луночные плашки с нейтравидином покрывали 10 нМ ВСМА человека, 10 нМ ВСМА яванского макака или 50 нМ истощающего Fc компонента, с последующим добавлением Fab-содержащих бактериальных супернатантов и детектированием специфически связывающихся Fab через их тэги Flag путем использования вторичного антитела против Flag/HRP. ИФА-положительные клоны экспрессировали бактериально в виде 1 мл культур в 96-луночном формате, и супернатанты подвергались кинетическому скринингу в эксперименте ProteOn. Было идентифицировано 500 положительных клонов, большинство из которых имеют сходную аффинность.

1.1.1A.4 Скрининг поверхностным плазмонным резонансом с растворимыми Fab и IgG

С помощью ППР (поверхностный плазмонный резонанс) были дополнительно протестированы 70 клонов. Все эксперименты проводили при 25 °C с использованием PBST в качестве рабочего буфера (10 мМ ФСБ, pH 7,4 и 0,005% (об./об.) Tween®20). Биосенсор ProteOn XPR36, снабженный сенсорными чипами GLC и GLM, и реагенты для связывания (10 мМ ацетат натрия, pH 4,5, сульфо-N-гидроксисукцинимид, 1-этил-3-(3-диметиламинпропил)-карбодиимид гидрохлорид [EDC] и этаноламин) были приобретены у BioRad Inc. (Геркулес, Калифорния). Иммуобилизации проводили при 30 мкл/мин на чипе GLM. pAb (коза) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичный Ab (Джексон) связывали в вертикальном направлении, используя стандартную процедуру аминного связывания: все шесть лигандных каналов активировали в течение 5 минут смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Сразу после активации поверхностей в течение 5 минут через все шесть каналов инъецировали pAb (коза) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичное антитело (50 мкг/мл, 10 мМ ацетата натрия, pH 5). Наконец, каналы блокировали 5-минутной инъекцией 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5). Конечные уровни иммуобилизации были похожими на всех каналах, в пределах от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab были захвачены из супернатантов *E. coli* путем одновременной инъекцией по пяти

раздельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 минут, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль «в системе» в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 минут по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 минут. Кинетические данные были проанализированы в ProteOn Manager v. 2.1. Обработка данных реакции точки включала применение этапа межточкового сопоставления и шага двойного сопоставления с применением буферного контроля «в системе» (Myszka, 1999). Обработанные данные из повторных однократных инъекций соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Для измерения IgG из супернатантов продуктов НЕК в 6-луночном формате, варианты IgG были захвачены из супернатантов НЕК293 путем одновременной инъекцией по пяти раздельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 минут, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до 400 RU; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль «в системе» в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 минут по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 минут. Кинетические данные были проанализированы как описано выше. Измерения OSK приведены в Таблице 2D; н/и, неокончательное измерение. Было обнаружено, что аффинность к ВСМА человека составляет от около 50 пМ до 5 нМ. Было обнаружено, что аффинность к ВСМА яванского макака составляет от около 2 нМ до 20 нМ (некоторые клоны выходят за пределы диапазона, смотрите Фиг. 17).

1.1.1A5. Дополнительный отбор клонов HC и LC

Благодаря своему опыту авторы изобретения отобрали из этих 70 клонов еще 27 клонов на основании их свойств связывания с ВСМА человека, ВСМА яванского макака, ВСМА мыши, и соотношения, измеренного в различных анализах. Из этих клонов были отобраны клоны 4VH и 9VL, что дало в результате 34 комбинации

VH/VL. Аффинность связывания измеряли на клетках НЕК-BCMA человека (НЕК-huBCMA) (Фиг. 18 и Таблица 2Е). Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значительно лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК. Однако Mab21, Mab 22, Mab27, Mab33, Mab39 и Mab42 были отобраны благодаря их общим свойствам, таким как аффинность к BCMA человека, BCMA яванского макака, связывание в качестве биспецифичного антитела с BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы H929, L363 и RPMI-8226 в проточной цитометрии, уничтожение миеломных клеток H929, L363 и RPMI-8226, жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациента, и данным фармакокинетики (ФК)) и фармакодинамики (уничтожение BCMA-положительных клеток) у яванских макаков.

Таблица 2С: Связь антител с оптимизационными потоками

Mab №	Получено из библиотеки 2 (НС)	Клон НС	Получено из библиотеки 1 (LC)	Клон LC
Mab 21	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 22	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 1	1C05
Mab 27	Оптимизационный поток 1	1A08	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 33	Оптимизационный поток 5	5D03	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 39	Оптимизационный поток 2	2E12	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 42	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 5	5A11

Таблица 2D: Однократные кинетические измерения аффинности к BCMA человека, яванского макака и мыши

Mab №	VH	VL	КД	КД	КД
			BCMA человека (huBCMA)	BCMA яванского макака (cyBCMA)	BCMA мыши (muBCMA)
83A10	pCON1532	pCON1080	1,5E-09	1,4E-08	н/и
Mab 21	pCON1531	pCON1522	2,8E-11	5,1E-11	7,3E-10
Mab 22	pCON1531	pCON1521	4,8E-11	н/и	9,0E-10

Mab 27	pCON1520	pCON1522	3,9E-13	1,0E-10	9,7E-10
Mab 33	pCON1530	pCON1522	1,7E-11	3,4E-11	4,9E-10
Mab 39	pCON1524	pCON1522	6,2E-11	2,7E-10	н/и
Mab 42	pCON1531	pCON1527	2,3E-10	3,9E-10	2,5E-09

Таблица 2Е: Связывание вариантов IgG на клетках HEK-huBCMA

Mab №	VH	VL	Связывани е EC50 [нМ]	Связывани е EC50 [мкг/мл]
83A10	PCON1532	PCON1080	2,4	0,34
Mab 14	PCON1530	PCON1527	1,47	0,21
Mab 21	pCON1531	PCON1522	2,46	0,35
Mab 22	PCON1531	pCON1521	2,08	0,30
Mab 23	PCON1531	PCON1519	4,97	0,71
Mab 27	PCON1520	PCOM1522	10,57	1,52
Mab 28	PCON1520	PCOM1521	11,34	1,63
Mab 30	PCON1530	PCON1526	10,35	1,49
Mab 31	PCON1530	PCON1525	1,34	0,19
Mab 33	pCOM1530	PCON1522	1,18	0,17
Mab 34	PCON1530	PCON1521	1,24	0,18
Mab 35	PCON1530	PCON1519	1,63	0,23
Mab 39	PCON1524	PCON1522	1,73	0,25
Mab 42	PCON1531	pCON1527	2,10	0,30
Mab 44	PCON1520	PCON1527	1,55	0,22

Пример 1.2: BCMA-экспрессирующие клетки как рабочие инструменты

Пример 1.2.1: Линии миеломных клеток человека, экспрессирующих BCMA на их поверхности, и количественное определение числа рецепторов BCMA на клеточной поверхности

Экспрессию BCMA оценивали на пяти линиях миеломных клеток человека (NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 и JJN-3) с помощью проточной цитометрии. Клетки NCI-H929 ((H929) ATCC® CRL-9068™) культивировали в 80-90% RPMI 1640 с 10-20% FCS (фетальная телячья сыворотка), инактивированной нагреванием, и могло содержать 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия и 50 мкМ меркаптоэтанол. Клетки RPMI-8226 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) культивировали в среде, содержащей 90% RPMI 1640 и 10% FCS, инактивированной нагреванием. Клетки U266B1 ((U266)

ATCC® TIB-196™) культивировали в среде RPMI-1640, модифицированной так, чтобы она содержала 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 4500 мг/л глюкозы и 1500 мг/л бикарбоната натрия, и 15% FCS, инактивированной нагреванием. Клеточную линию L-363 (Институт Лейбница DSMZ - Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур; DSMZ № ACC 49) культивировали в 85% RPMI 1640 и 15% FCS, инактивированной нагреванием. Клеточную линию JJN-3 (DSMZ № ACC 541) культивировали в 40% MEM Дульбекко + 40% MDM Искова + 20% FBS, инактивированной нагреванием. Вкратце, клетки собирали, промывали, подсчитывали количество жизнеспособных, ресуспендировали до 50000 клеток/лунка в 96-луночной круглодонной плашке и инкубировали с анти-huBCMA антителом (Abscam, кат. № ab54834, мышиный IgG1) в количестве 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °C (для предотвращения интернализации). В качестве изотипного контроля использовали мышиный IgG1 (BD Biosciences, кат. № 554121). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 350 × g), дважды промывали и инкубировали с FITC-конъюгированным вторичным анти-мышиным антителом в течение 30 минут при 4 °C. В конце времени инкубации клетки центрифугировали (5 мин при 350 × g), дважды промывали буфером FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали на устройстве Cantoll, с запущенным программным обеспечением FACS Diva. Относительное количественное определение числа рецепторов BCMA на плазматической мембране клеток миеломных линий H929, RPMI-8226 и U266B1 оценивали с помощью анализа QIFIKIT (Dako, кат. № K0078, следуя инструкциям производителя). Клетки H929 экспрессировали BCMA человека с самой высокой плотностью, вплоть до 5-6 раз большей чем у других миеломных клеточных линиях. H929 рассматривается как линия миеломных клеток с высокой экспрессией BCMA по сравнению с U266 и L363, которые представляют собой миеломные клетки со средней/низкой экспрессией BCMA, RPMI-8226, которая представляет собой миеломные клетки с низкой экспрессией BCMA, и JJN-3, которая представляет собой миеломные клетки с очень низкой экспрессией BCMA. Таблица 3 подводит итог по данным относительного числа рецепторов BCMA на клеточной поверхности клеток линий множественной миеломы человека в каждом эксперименте (n = 5).

Таблица 3: Количественное определение числа рецепторов ВСМА на плазматической мембране человеческих клеток миеломных линий H929, L363, RPMI-8226, U266B1 и JJN-3

Линии миелом ных клеток человек а	Специфическая антиген-связывающая способность (SABC)				
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4	Эксперимент 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16,970	/	11300	11228	/
U266(B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072
JJN-3	/	/	/	/	650

Пример 2: Анализ связывания BCMA: поверхностный плазмонный резонанс

Оценка связывания анти-BCMA антител с рекомбинантным BCMA с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) производится следующим образом. Все ППР-эксперименты проводили на Biacore T200 при 25 °C с HBS-EP в качестве рабочего буфера (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% ПАВ P20, Biacore, Фрайбург, Германия). Определяли avidность взаимодействия между анти-BCMA антителами и рекомбинантным Fc(kih) BCMA (человека и яванского макака). Биотинилированный рекомбинантный Fc(kih) BCMA человека и яванского макака прямо связывали на чипе SA, следуя инструкциям (Biacore, Фрайбург/Германия). Уровень иммобилизации колебался от 200 до 700 RU. Анти-BCMA антитела пропускали в диапазоне 2-кратных концентраций (от 1,95 до 500 нМ) с потоком 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 секунд. Диссоциацию наблюдали в течение 180 секунд. Различия в объемном показателе преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного на контрольной проточной ячейке. В данном случае анти-BCMA антитела проходили через пустую поверхность, предварительно активированную и дезактивированную, как описано в стандартном наборе связывания амина. Видимые кинетические константы были получены с использованием Biacore T200 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Упсала/Швеция), чтобы согласовать уравнения скорости для связывания Ленгмюра 1:1 путем численного интегрирования, несмотря на бивалентность взаимодействия для целей сравнения. Также была определена аффинность взаимодействия между анти-BCMA антителами и рекомбинантным человеческим Fc(kih) BCMA. Анти-человеческий Fab

антитело (GE Healthcare) прямо связывали на чипе CM5 при pH 5,0, используя стандартный набор для связывания амина (Biacore, Фрайбург, Германия). Уровень иммобилизации составил около 6500 RU. Анти-BCMA антитело захватывали в течение 90 секунд при 25 нМ. Рекомбинантный человеческий Fc(kih) BCMA пропускали в 4-кратном диапазоне концентраций (от 1,95 до 500 нМ) с скоростью 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 секунд. Диссоциацию наблюдали в течение 120 секунд. Различия в объемном показателе преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного на контрольной проточной ячейке. Здесь рекомбинантный BCMA проходил над поверхностью с иммобилизованным анти-человеческий Fab антителом, но на который наносили HBS-EP, а не анти-BCMA антитело. Кинетические константы были получены с использованием Biacore T100 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Упсала/Швеция), чтобы подогнать уравнения скорости для связывания Ленгмюра 1:1 путем численного интегрирования (Таблица 4).

Таблица 4. Константы аффинности, определенные с помощью подогнанных уравнений скорости для связывания Ленгмюра 1:1

Лиганд	Аналит	Кс[1/Мс]	Кот[1/с]	КД[М]
83A10 IgG	huBCMA Fc(kih)	5,07E+05	2,92E-03	5,76E-09
	cytoBCMA Fc(kih)	2,29E+05	2,03E-02	8,86E-08
Mab 21 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,51E+05	4,39E-05	5,16E-11
	cytoBCMA Fc(kih)	4,91E+05	2,35E-04	4,78E-10
Mab 22 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,14E+05	5,15E-05	6,33E-11
	cytoBCMA Fc(kih)	4,54E+05	4,42E-04	9,74E-10
Mab 42 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,03E+05	2,98E-04	3,71E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	7,07E+05	4,53E-04	6,41E-10
Mab 27 IgG	huBCMA Fc(kih)	3,59E+05	5,93E-05	1,65E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	2,16E+05	4,55E-04	2,11E-09
Mab 33 IgG	huBCMA Fc(kih)	2,00E+05	3,55E-05	1,78E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	1,32E+05	9,76E-05	7,39E-10
Mab 39 IgG	huBCMA Fc(kih)	3,61E+05	5,58E-05	1,55E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	2,15E+05	4,67E-04	2,17E-09

Пример 3: Различие в аффинности для человека/яванского макака (человек/яванский макак)

Исходя из значений аффинности, описанных в Примере 2, сравнивали аффинность анти-BCMA антител к BCMA человека в сравнении с BCMA яванского макака, и вычисляли значения отношения аффинности (различие) яванский макак/человек (Таблица 5). Различие в аффинности яванский макак/человек было рассчитано как аффинность антитела к BCMA яванского макака, разделенная на аффинность к BCMA человека, и означает, что антитело к BCMA связывается с BCMA человека с x -кратной аффинностью связывания, по сравнению с BCMA яванского макака, где x = величина различия яванский макак/человек. Результаты приведены в Таблице 5.

Таблица 5: Аффинность анти-BCMA антител к BCMA человека в сравнении с BCMA яванского макака и значения различия человек/яванский макак

α -BCMA IgG	Кд для BCMA человека [M]	КД для BCMA яванского макака [M]	Различие аффинности яванский макак/человек
83A10	5,76E-09	8,86E-08	15,3
Mab 21	5,16E-11	4,78E-10	9,3
Mab 22	6,33E-11	9,74E-10	15,4
Mab 42	3,71E-10	6,41E-10	1,7
Mab 27	1,65E-10	2,11E-09	12,7
Mab 33	1,78E-10	7,39E-10	4,2
Mab 39	1,55E-10	2,17E-09	14

Пример 4: Создание биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител

Биспецифичные анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела были получены в соответствии с WO 2014/122144, который включен посредством ссылки.

Пример 4.1: Анти-CD3 антитела

Как применяется в данном документе, термин «CD3ε или CD3» относится к CD3 ε человека, описанному в UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин «антитело к CD3, анти-CD3 антитело» относится к антителу, связывающемуся с CD3ε. Предпочтительно антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO:1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответственно CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO:4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответственно CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Предпочтительно антитело содержит переменные домены SEQ ID NO:7 (VH) и SEQ ID NO:8 (VL). Анти-CD3 антитело, как описано выше, использовали для

получения биспецифичных антител к Т-лимфоцитам, которые использовали в следующих примерах.

Пример 4.2: Создание биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в Fc-содержащей 2+1 форме

В качестве исходных материалов были использованы кДНК, кодирующие полные тяжелые и легкие цепи соответствующих анти-BCMA IgG1 антител, а также анти-CD3 VH и VL кДНК. Для каждого биспецифичного антитела были задействованы четыре белковые цепи, включающие в себя тяжелую и легкую цепи соответствующего анти-BCMA антитела, и тяжелую и легкую цепи анти-CD3 антитела, описанных выше, соответственно. Чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов с неправильно спаренными тяжелыми цепями, например, с двумя тяжелыми цепями анти-CD3 антитела, используют мутированную гетеродимерную область Fc, несущую «мутации выступ-в-отверстие» и сконструированную дисульфидную связь, как описано в WO2009080251 и в WO2009080252. Чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов с ошибочно спаренными легкими цепями, например с двумя легкими цепями анти-BCMA антитела, к тяжелым и легким цепям анти-CD3 антитела применяют кроссовер CH1 x каппа константой области с использованием методов, описанных в WO2009080251 и в WO2009080252.

а) Биспецифичное анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитело в форме 2+1, т. е. биспецифичное $(Fab)_2 \times (Fab)$ антитело, которое является бивалентным для BCMA и моновалентным для CD3, будет иметь преимущества в отношении активности, предсказуемости в эффективности и безопасности, потому что оно будет предпочтительно связываться с мишенью BCMA опухоли и избегать уменьшения антителом к CD3, таким образом, повышается вероятность воздействия лекарственного средства на опухоль.

Были получены бивалентные для BCMA и моновалентные для CD3 с Fc анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела биспецифичной формы 2+1 (то есть биспецифичные $(Fab)_2 \times (Fab)$), для ранее отобранных антител к BCMA человека. кДНК, кодирующие полные Fab (домены VH и CH1 тяжелой цепи плюс домены VL и CL легкой цепи) соответствующих анти-BCMA IgG1 антител, а также кДНК VH и VL анти-CD3, использовали в качестве исходных материалов. Для каждого

биспецифичного антитела были задействованы четыре белковые цепи, включающие в себя тяжелую и легкую цепи соответствующего анти-BCMA антитела, и тяжелую и легкую цепи анти-CD3 антитела, описанные выше, соответственно, с областями Fc.

Вкратце, каждое биспецифичное антитело получают одновременной ко-трансфекцией четырех экспрессирующих векторов млекопитающих, кодирующих соответственно: а) кДНК полной легкой цепи соответствующего антитела к BCMA; б) гибридную кДНК, создаваемую стандартными способами молекулярной биологии, такими как ПЦР с сплайс-перекрывающимися праймерами, кодирующую гибридный белок, состоящий из (в порядке от N- до C-конца) секреторной лидерной последовательности, Fab (VH, за которым следуют домены CH1) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого глицин (Gly)-серинового (Ser) линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Fab (VH, за которым следуют домены CH1) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого глицин (Gly)-серинового (Ser) линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, VH анти-CD3 антитела, описанного выше, и константного каппа-домена кДНК легкой цепи человека; в) гибридную кДНК, создаваемую стандартными методами молекулярной биологии, такими как ПЦР с сплайс-перекрывающимися праймерами, кодирующую гибридный белок, состоящий из (в порядке от N- до C-конца) секреторной лидерной последовательности, VL анти-CD3 антитела, описанного выше, константного домена CH1 кДНК IgG1 человека. Ко-трансфекция клеток млекопитающих, и получение и очистка антител с использованием способов, описанных выше для получения человеческих или гуманизированных антител IgG1, с одной модификацией: для очистки антител первый этап захвата не проводится с использованием белка А, а вместо этого выполняется с использованием колонки для аффинной хроматографии, заполненной смолой, связывающейся с константной областью легкой цепи каппа человека, такой как KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Кроме того, может быть включен дисульфид для увеличения стабильности и выхода, также как и дополнительные остатки, формирующие ионные мостики и увеличивающих выход гетеродимеров (EP 1870459A1).

Для создания векторов биспецифичных антител BCMAxCD3, биспецифичные молекулы, полученные из IgG1, состоят по меньшей мере из двух антиген-связывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами - CD3 и BCMA. Антиген-связывающие фрагменты представляли собой фрагменты Fab, состоящие из тяжелой и легкой цепей, каждая из которых содержит вариабельную и константную области. По меньшей мере, один из фрагментов Fab представлял собой фрагмент «Crossfab», в котором константные домены тяжелой и легкой цепи Fab были обменены друг на друга. Обмен константных доменов тяжелой и легкой цепей в пределах фрагмента Fab гарантирует, что фрагменты Fab различной специфичности не имеют идентичного расположения доменов и, следовательно, не обмениваются легкими цепями. Конструкция биспецифичной молекулы была моновалентной для CD3 и бивалентной для BCMA, причем один фрагмент Fab сливают с N-концом внутреннего CrossFab (2+1). Биспецифичная молекула содержала часть Fc, чтобы иметь более длинный период полужизни. Схематическое представление конструкций приведено на Фиг. 1-3; последовательности предпочтительных конструкций показаны в Таблице 2А. Молекулы были получены путем ко-трансфекции клеток HEK293 EBNA, растущих в суспензии, экспрессирующими векторами млекопитающих, с использованием раствора на основе полимера. Для приготовления конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими векторами экспрессии в соотношении 1:2:1:1 («вектор Fc (выступ)»: «вектор легкой цепи»: «вектор легкой цепи CrossFab» : «вектор тяжелой цепи CrossFab»).

Пример 4.3: Создание биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител для сравнения.

Создание BCMA50-sc(Fv)₂ (также известного как BCMA50-BiTE®) анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов биспецифичного антитела и применяемых аминокислотных последовательностей было в соответствии с WO2013072406 и WO2013072415.

Пример 5: Получение и очистка биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Fc-содержащих (2+1) Т-лимфоцитов антител с вариантами по заряду

Биспецифичные анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела были получены и очищены в соответствии с WO 2014/122144, который включен посредством ссылки.

Для получения биспецифичных антител биспецифичные антитела экспрессировали путем временной ко-трансфекции соответствующих экспрессирующих векторов млекопитающих в клетках HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии, используя раствор на основе полимера. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в количестве 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавлением 6 mM L-глутамина. Центрифугировали 2,0 млн. жизнеспособных клеток на каждый мл объема конечного продукта (5 минут при $210 \times g$). Аспирировали супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК на каждый мл объема конечного продукта готовили путем смешивания 1 мкг ДНК (соотношение тяжелая цепь: модифицированная тяжелая цепь: легкая цепь: модифицированная легкая цепь = 1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимера (1 мг/мл) смесь встряхивали в течение 15 секунд и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. Через 10 минут ресуспендированные клетки и смесь ДНК/раствор на основе полимера объединяли и затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали в встряхивающее устройство (37 °C, 5% CO₂). После 3 часов инкубации на каждый мл объема конечного продукта добавляли 800 мкл среды Ex-Cell, дополненной 6 mM L-глутамина, 1,25 mM вальпроевой кислоты и 12,5% Pepsoy (50 г/л). Через 24 часа на каждый мл конечного объема продукта добавляли 70 мкл питательного раствора. Через 7 дней, или когда жизнеспособность клеток составляла или была ниже 70%, клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали с помощью этапа аффинного связывания и одного или двух этапов дополнительной очистки с использованием катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. При необходимости использовали дополнительный этап очистки.

На этапе аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку с белком A (HiTrap Protein A FF, 5 мл, GE Healthcare), уравнивали 6 CV 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, pH 7,5. После этапа промывки тем же буфером антитело элюировали из колонки путем поэтапного элюирования 20 mM фосфатом натрия, 100 mM хлорида натрия, 100 mM глицином, pH 3,0. Фракции с желаемым антителом немедленно нейтрализовали 0,5 M фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно

фильтровали и дополнительно подвергали обработке катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Для этапа катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 элюирующим буфером, используемым для этапа аффинного связывания, и загружали в катионообменную колонку (Poros 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки уравнивающим буфером и промывочным буфером, соответствующие 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ трис, pH 5,0 и 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ трис, 100 мМ хлорида натрия, pH 5,0, белок элюировали с помощью градиента, используя 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ TRIS, 100 мМ хлорида натрия, pH 8,5. Фракции, содержащие желаемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке на этапе эксклюзионной хроматографии.

Для этапа эксклюзионной хроматографии концентрированный белок вводили в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), с 20 мМ гистидина, 140 мМ хлорида натрия, pH 6,0 с или без Tween 20, в качестве состава буфера. Фракции, содержащие мономеры, объединяли, концентрировали центрифугированием и стерильно фильтровали в стерильный флакон.

Определение концентрации антител осуществляли путем измерения поглощения при 280 нм, используя теоретическое значение поглощения в 0,1% растворе антитела. Эта величина была основана на аминокислотной последовательности и рассчитана с помощью программного обеспечения GPMW (Lighthouse data).

Чистоту и содержание мономера в конечном белковом препарате определяли с помощью CE-SDS (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, колонка для аналитической эксклюзионной хроматографии (Tosoh)) в буфере 25 мМ фосфата калия, 125 мМ хлорида натрия, 200 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,02% (мас./об.) азида натрия, pH 6,7.

Для подтверждения молекулярной массы конечных белковых препаратов и подтверждения гомогенного препарата молекул конечного белкового раствора использовали жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС). Сначала был проведен этап дегликозилирования. Для удаления гетерогенности, вносимой

углеводами, конструкции обрабатывали PNGaseF (ProZyme). Поэтому pH раствора белка доводили до pH 7,0 путем добавления 2 мкл 2 М триса к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGaseF и инкубировали в течение 12 часов при 37 °С. Затем было выполнено обнаружение ЖХ-МС в работающем режиме. Способ ЖХ-МС выполняли на ВЭЖХ Agilent 1200, соединенном с масс-спектрометром TOF 6441 (Agilent). Хроматографическое разделение проводили на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6 x 250 мм; кат. № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05% (об./об.) муравьиной кислоты в воде, элюент В представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40 °С и 6 мкг (15 мкл) образца белка, полученного обработкой, как описано выше.

В течение первых 4 минут элюат направляли в отходы для защиты масс-спектрометра от солевого загрязнения. ESI-источник работал с потоком осушающего газа 12 л/мин, температурой 350 °С и давлением распылителя 60 фунтов на квадратный дюйм. Спектры МС получали с использованием напряжения фрагментатора 380 В и диапазоном масс от 700 до 3200 м/z в режиме положительных ионов. Данные МС были получены с помощью программного обеспечения прибора с 4 по 17 минуты.

Фигура 10 EP14179705 (включен посредством ссылки) изображает графики CE-SDS (не сжатые) конечных белковых препаратов после различных способов очистки для антител 83A10-TCB и 83A10-TCBcv. Этапы аффинной хроматографии с белком А (РА) и эксклюзионной хроматографии (SEC), применяемые к антителу 83A10-TCB, давали чистоту <30% и 82,8% содержания мономера (А). Когда дополнительные этапы очистки, включая катионообменную хроматографию (cIEX) и этапы эксклюзионной хроматографии конечного размера (re-SEC) применяли к конечным белковым препаратам в (А), чистота увеличивалась до 93,4%, но содержание мономера оставалось тем же, и выход был значительно снижен до 0,42 мг/л. Однако, когда были применены специфические модификации по заряду к анти-BCMA Fab CL-SH1 83A10, а именно к антителу 83A10-TCBcv, уже можно было наблюдать превосходный профиль продуцирования/очистки молекулы TCB, о чем свидетельствуют чистота 95,3%, содержание мономера 100% и выход вплоть до 3,3

мг/л, даже когда применялись этапы очистки PA+cIEX+SEC (C) по сравнению с (B) с профилем производства/очистки, показывающим в 7,9-раз ниже выход и на 17,2% ниже содержание мономера, несмотря на включение дополнительного этапа очистки повторной SEC.

Затем был проведен цикл прямого сравнительного производства для сравнения профиля продуцирования/очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCB_{sv} для дополнительной оценки преимуществ модификаций по заряду CL-CH1, применяемых к антителам. Молекулы 83A10-TCB и 83A10-TCB_{sv} имеют молекулярную форму, как описано в Фиг. 2A. Как изображено на Фиг. 11, свойства антител 83A10-TCB и 83A10-TCB_{sv} измерялись параллельно и сравнивались после каждого этапа очистки: 1) только аффинная хроматография с белком А (A, B), 2) аффинная хроматография с белком А, затем SEC (C, D) и 3) аффинная хроматография с белком А, затем SEC, затем CIEХ и повторно SEC (E, F). Графики CE-SDS (не сжатые) конечных белковых растворов после соответствующих способов очистки для антител 83A10-TCB и 83A10-TCB_{sv} показаны на Фиг. 11 EP14179705 (включен посредством ссылки). Как показано на Фиг. 11A и 11B в EP 14179705 (включен посредством ссылки), улучшения при применении вариантов по заряду к антителу TCB уже наблюдались после очистки только с помощью аффинной хроматографии с белком А. В таком прямом сравнительном исследовании этап очистки с помощью аффинной хроматографии с белком А, применяемый к антителу 83A10-TCB, дал чистоту 61,3%, выход 26,2 мг/л и содержания мономера 63,7% (11A). Для сравнения, когда антитело 83A10-TCB_{sv} очищали аффинной хроматографией с белком А, все параметры были улучшены - лучшая чистота 81,0%, лучший выход 51,5 мг/л и содержания мономера 68,2% (11B). Когда применяли дополнительный этап очистки SEC к конечным белковым препаратам, как показано на Фиг. 12A и 12B в EP14179705 (включен посредством ссылки), чистота 83A10-TCB достигла 69,5%, выход 14,1 мг/л и содержание мономера 74,7% (C) по сравнению с 83A10-TCB_{sv} с улучшенной чистотой и содержанием мономеров вплоть до 91,0% и 83,9%, соответственно, и с выходом 10,3 мг/л (D). Несмотря на то, что выход был немного меньше (т. е. на 27% меньше) для 83A10-TCB_{sv}, чем для 83A10-TCB в данном конкретном эксперименте, процент правильной молекулы был намного выше для 83A10-TCB_{sv}, чем для 83A10-TCB,

соответственно, 90% по сравнению с 40-60%, по данным ЖХ-МС. В третьем прямом сравнении, конечные белковые препараты 83A10-TCB и 83A10-TCVcv из Фиг. 11C и 11D EP14179705 (включен посредством ссылки) объединяли примерно с 1 л (эквивалентом) соответствующих конечных белковых препаратов из другой партии очистки (то же приготовление) только после этапа очистки с помощью аффинной хроматографии с белком А. Затем объединенные белковые препараты дополнительно очищали способами очистки cIEX и SEC. Как показано на Фиг. 11E и 11F в EP 14179705 (включен посредством ссылки), постоянно наблюдалось улучшение профиля продуцирования/очистки антитела TCB с вариантами по заряду по сравнению с антителом TCB без вариантов по заряду. После того как было использовано несколько этапов способов очистки (например, PA +/- SEC + cIEX + SEC) для очистки антитела 83A10-TCB, была достигнута чистота только 43,1% и было достигнуто содержания мономера 98,3%, но в ущерб выходу, который был снижен до 0,43 мг/л. Процент правильной молекулы, измеренный методом ЖХ-МС, все еще был низким - 60-70%. В конце концов, качество конечного белкового препарата было неприемлемым для использования *in vitro*. В противоположность этому, когда к антителу 83A10-TCVcv применялись одинаковые этапы множественной очистки с одинаковой хронологией, достигалась чистота 96,2% и содержание мономера 98,9%, а также 95% правильной молекулы, как измерено ЖХ-МС. Однако выход также значительно снижался до 0,64 мг/л после этапа очистки cIEX. Результаты показывают, что лучшая чистота, более высокое содержание мономера, более высокий процент правильной молекулы и лучший выход могут быть достигнуты с антителом 83A10-TCVcv только после двух стандартных этапов очистки, то есть аффинной хроматографии с белком А и SEC (Фиг. 11D EP14179705), в то время как такие параметры не могут быть достигнуты с 83A10-TCB, даже если были применены дополнительные этапы очистки (Фиг. 11E в EP14179705).

В Таблице 12 EP14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после этапа очистки с белком А. В Таблице 13 EP14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после этапа очистки с белком А и SEC. В Таблице 14 EP14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv с

последующим применением блека А и SEC плюс белок А, затем этапов очистки сIEX и re-SEC. Для Таблиц 12-14 EP14179705 (включен посредством ссылки) значения, выделенные жирным шрифтом, подчеркивают превосходные свойства при сравнении между 83A10-TCB и 83A10-TCB_{cv}. За одним исключением (т. е. соответственным количеством выхода, см. Таблицу 13 в EP14179705 (включен посредством ссылки)), которое может быть не репрезентативным, все параметры и значения продуцирования/очистки, полученные в результате трех экспериментов прямого сравнения, были лучше для 83A10-TCB_{cv} по сравнению с 83A10-TCB. Общие результаты четко демонстрируют, что преимущества в особенностях продуцирования/очистки могут быть достигнуты с помощью применения модификаций по заряду CL-CH1 к антителам TCB, и что для получения и без того высококачественных белковых препаратов с очень хорошими свойствами изготовления требуется всего два этапа очистки (т. е. аффинная хроматография с белком А и SEC). Исходя из улучшенных свойств продуцирования/очистки 83A10-TCB_{cv}, 21-TCB_{cv}, 22-TCB_{cv}, 27-TCB_{cv}, 33-TCB_{cv}, 39-TCB_{cv} и 42-TCB_{cv} были созданы варианты по заряду, аналогично 83A10-TCB_{cv}.

Таблица 6: Профиль производства/очистки биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапа очистки аффинной хроматографией с белком А

	83A10-TCB	83A10-TCB _{cv}
Чистота (%)	61,3	81,0
Выход (мг/л)	26,2	51,5
Количество (мг)	24,3	50,2
Мономер (%)	63,7	68,2
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	н. д.	н. д.

Таблица 7: Профиль производства/очистки биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапов очистки аффинной хроматографией с белком А и эксклюзионной хроматографией

	83A10-TCB	83A10-TCB _{cv}
--	-----------	-------------------------

Чистота (%)	69,5	91,0
Выход (мг/л)	14,1	10,3
Количество (мг)	13,1	10,0
Мономер (%)	74,7	83,9
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	40-60	90

Таблица 8: Профиль производства/очистки биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапов очистки 1.a) аффинной хроматографией с белком А и эксклюзионной хроматографией и 1.b) только аффинной хроматографии с белком А с объединением с 2) катионообменной хроматографией и 3) эксклюзионной хроматографией конечного размера

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	43,1	96,2
Выход (мг/л)	0,43	0,64
Количество (мг)	0,73	1,27
Мономер (%)	98,3	98,9
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	60-70%	>95%

Пример 6: Связывание биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы (проточная цитометрия)

Антитела TCB анти-BCMA/анти-CD3 (21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv, 83A10-TCBcv) анализировали с помощью проточной цитометрии на связывание с BCMA человека на BCMA-экспрессирующих клетках H929, L363 и RPMI-8226. MKN45 (человеческая клеточная линия аденокарциномы желудка, которая не экспрессирует BCMA) использовали в качестве отрицательного контроля. Вкратце, культивированные клетки собирают, подсчитывают и жизнеспособность клеток оценивают с использованием ViCell. Затем жизнеспособные клетки доводят до 2×10^6 клеток на

мл в BSA-содержащем окрашивающем буфере FACS (BD Biosciences). Дополнительно делали аликвоты по 100 мкл/лунка такой клеточной суспензии в круглодонной 96-луночной плашке, и инкубировали с 30 мкл анти-BCMA антитела или соответствующего контроля IgG в течение 30 мин при 4 °C. Все анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (и контрольные TCB) титровали и анализировали в конечном диапазоне концентраций от 1 до 300 нМ. Затем клетки центрифугировали (5 минут, 350 x g), промывали 120 мкл/лунка окрашивающим буфером FACS (BD Biosciences), ресуспендировали и инкубировали в течение дополнительных 30 минут при 4 °C с флуорохром-конъюгированным PE-конъюгированным козьим AffiniPure F(ab')₂ фрагментом, специфическим к человеческому Fc-фрагменту IgG (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Затем клетки дважды промывали окрашивающим буфером (BD Biosciences), фиксировали, используя 100 мкл/лунка буфера для фиксации BD (кат. № BD Biosciences, 554655) при 4 °C в течение 20 минут, ресуспендировали в 120 мкл буфера FACS и анализировали с использованием BD FACS Cantoll. Когда это применимо, EC50 рассчитывали с использованием Prism GraphPad (LaJolla, CA, USA), и значения EC50, обозначающие концентрацию антитела, необходимую для достижения 50% от максимального связывания для связывания анти-BCM/анти-CD3 TCB антител с клетками H929, клетками L363 и клетками RPMI-8226 подытожены в Таблице 8, Таблице 9 и Таблице 10 соответственно. Звездочка обозначает оцененные значения EC50 как экстраполированные и рассчитанные с помощью программного обеспечения Prism. Не были рассчитаны значения EC50 для связывания 21-TCBcv с клетками L363 и связывания 22-TCBcv с клетками RPMI-8226

Таблица 8: Значения EC50 для связывания биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы H929

Расчитанное EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	12,0	11,0	7,9	13,6
мкг/мл	1,725	1,589	1,142	1,956

Таблица 9: Значения EC50 для связывания биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы L363

Расчитанное EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	17,4	/	30,0	3,8
мкг/мл	2,507	/	4,328	0,5534

Таблица 10: Значения EC50 для связывания биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы RPMI-8226

Расчитанное EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	~ 188428*	6,8	/	13,2
мкг/мл	~ 27151*	0,9817	/	1,907

Пример 7: Продуцирование цитокинов активированными Т-лимфоцитами при связывании биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с CD3-положительными Т-лимфоцитами и BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы (анализ СВА с выделением цитокинов)

Биспецифичные анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела анализируют на их способность индуцировать опосредованное Т-лимфоцитами продуцирование цитокинов *de novo* в присутствии или в отсутствие человеческих BCMA-экспрессирующих клеток миеломы человека (RPMI-8226, JJN-3). Вкратце, человеческие МКПК выделяют из лейкотромбоцитарного слоя, и 0,3 миллиона клеток/лунка помещают в круглодонный 96-луночный планшет. В альтернативном варианте, 280 мкл цельной крови здорового донора высевает в каждую лунку 96-луночной плашки с глубокими лунками. BCMA-положительные опухолевые клетки-мишени добавляют для получения конечного соотношения Е:Т 10:1. Анти-BCMA/анти-CD3 ТCB антитела и контроля добавляют до конечной концентрации 0,1 пМ - 10 нМ. После инкубации, составляющей вплоть до 24 часов при 37 °С, 5% CO₂, плашку для анализа центрифугируют в течение 5 минут при 350 × g и супернатант переносят в новую 96-луночную плашку с глубокими лунками для последующего анализа. Анализ СВА проводили на FACS Cantoll в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II Th1/Th2 цитокинов человека (BD кат. № 551809), либо комбинацию следующих наборов СВА Flex: гранзим В человека (BD кат. № 560304), набор Flex ИНФ-γ человека (BD кат. № 558269), набор Flex ФНО-α□

человека (BD кат. № 558273), набор Flex ИЛ-10 человека (BD кат. № 558274), набор Flex ИЛ-6 человека (BD кат. № 558276), набор Flex ИЛ-4 человека (BD кат. № 558272), набор Flex ИЛ-2 человека (BD кат. № 558270). В Таблице 13 показано, что 83A10-TCV индуцировал зависимое от концентрации увеличение выработки цитокинов и сериновой протеазы гранзима В, маркера цитотоксической функции Т-лимфоцитов. В Таблице 11 приведены значения EC50 и количество секретируемых цитокинов/протеаз для каждой концентрации биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител.

Таблица 11. Секреция цитокинов и протеаз, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами в присутствии клеток RPMI-8226

Цитокины/ протеазы	EC50 (нМ)	Концентрация 83A10-TCV (нМ)						
		0,0006 4	0,003 2	0,016	0,08	0,4	2	10
ФНО- α (пкг/мл)	0,52	-6,95	-6,49	-0,65	46,72	161,24	315,11	371,47
ИЛ-10 (пкг/мл)	0,30	-9,21	1,95	25,17	125,82	401,42	602,64	680,05
Гранзим В (пкг/мл)	0,34	220,54	331,5 5	889,13	5855,0 2	15862,8 4	21270,4 3	27120, 52

Пример 8: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на клетки миеломы H929 с высокой экспрессией BCMA, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (колориметрический анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-BCMA/анти-CD3 TCV антитела анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с высокой экспрессией BCMA при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, клетки-мишени H929 множественной миеломы с высоким уровнем экспрессии BCMA человека собирали с помощью буфера диссоциации клеток, промывали и ресуспендировали в RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевали в 96-луночную плашку с круглыми доньями и добавляли соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации были в

диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции ТСВ и контроли были подогнаны до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней H929 MM (= 100%) определяли путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (= 0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифичного антитела к Т-лимфоцитам. После 20-24-часовой или 48-часовой инкубации при 37 °С, 5% CO₂, высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней MM в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC₅₀ измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на Фиг. 4, все анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВсv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение BCMA-положительных миеломных клеток H929, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток H929 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с BCMA-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой протестированной концентрации. В Таблице 12 подытожены значения EC₅₀ для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток H929, с высокой экспрессией BCMA, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 12: Значения EC₅₀ для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток H929, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антителами

	EC ₅₀ (nM)
--	-----------------------

Анти- BCMA/анти- CD3 TCB антитела	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5	Донор 6
21-TCBcv	97,1	/	42,1	53,9	38,7	/
22-TCBcv	53,2	/	42,2	23,2	28,9	/
42-TCBcv	9,7	/	11,7	7,2	6,8	/
83A10-TCBcv	3,9	/	8,5	5,0	4,3	1,5

Пример 9: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки L363 с средней/низкой экспрессией BCMA, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках MM с средней/низкой экспрессией BCMA при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, клетки-мишени L363 множественной миеломы с средней/низкой экспрессией BCMA человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевают в 96-луночную плашку с круглым доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли TCB доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации, максимальный лизис клеток-мишеней MM (= 100%) определяют путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, индуцируя гибель клеток. Минимальный лизис (= 0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифичного антитела к Т-

лимфоцитам. После 20-24-часовой инкубации при 37 °С, 5% CO₂, высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC50 измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на Фиг. 5, все анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-TCBcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение BCMA-положительных миеломных клеток L363, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток L363 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с BCMA-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой протестированной концентрации. В Таблице 13 подытожены значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток L363, с средней/низкой экспрессией BCMA, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 13: Значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток L363, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антителами

Анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антитела	EC50 (нМ)				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
21-TCBcv	83,6	38,4	18,9	19,1	46,4
22-TCBcv	97,5	27,7	16,5	14,6	56,0
42-TCBcv	15,5	16,7	5,2	2,2	10,6
83A10-TCBcv	16,8	47,8	28,4	12,6	39,0

Пример 10: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки RPMI-8226 с средней/низкой экспрессией BCMA, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с средней/низкой экспрессией BCMA при перекрестном связывании конструкции,

через связывание антиген-связывающих фрагментов с ВСМА на клетках. Вкратце, клетки-мишени L363 множественной миеломы с средней/низкой экспрессией ВСМА человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевает в 96-луночную плашку с круглыми доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли ТСВ доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней ММ (= 100%) определяли путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (= 0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифичного антитела к Т-лимфоцитам. После 20-24-часовой инкубации при 37 °С, 5% CO₂, высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифичных анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC₅₀ измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на Фиг. 6, все анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВ_{scv}) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение ВСМА-положительных миеломных клеток RPMI-8226, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток RPMI-8226 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с ВСМА-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой

протестированной концентрации. В Таблице 13 подытожены значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226, с средней/низкой экспрессией ВСМА, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 13: Значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела	EC50 (нМ)				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
21-TCBcv	/	41,3	8,8	4,0	8,4
22-TCBcv	/	47,6	7,6	3,2	5,5
42-TCBcv	/	382,8	18,7	3,5	1,5
83A10-TCBcv	/	620,5	229,3	35,0	64,9

Пример 11: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки JJN-3 с низкой экспрессией ВСМА, индуцированная биспецифичными анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с низкой экспрессией ВСМА при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с ВСМА на клетках. Вкратце, клетки-мишени JJN-3 множественной миеломы с низкой экспрессией ВСМА человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевает в 96-луночную плашку с круглым доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 нМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли ТСВ доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней ММ (= 100%) определяли

путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (= 0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифичного антитела к Т-лимфоцитам. i) После 48 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂, культивированные клетки миеломы собирали, промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом, и аннексином-V для определения апоптотических миеломных клеток. Окрашивающая панель состояла из CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/аннексин-V-PerCP-Cy5.5. Используемые антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния). Сбор данных осуществляли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных использовалась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). Аннексин-V измеряли на клетках JJN-3, и процент аннексин-в-положительных клеток JJN-3 наносили на график в зависимости от концентрации биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител. Процент лизиса клеток JJN-3, вызванный определенной концентрацией биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела определяли путем измерения абсолютного количества аннексин-V-отрицательных клеток JJN-3 при данной концентрации TCB и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-отрицательных клеток JJN-3 без TCB; деля на абсолютное количество аннексин-V-отрицательных клеток JJN-3 без TCB. Фиг. 7 иллюстрирует то, что все анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (22-, 42- и 83A10-TCBcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение миеломных клеток JJN-3 с низкой экспрессией BCMA, измеренное с помощью проточной цитометрии. Лизис клеток JJN-3 был специфическим, поскольку контрольное антитело TCB, которое не связывается с BCMA-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует лизис аннексин-V-положительных клеток JJN-3 или клеток JJN-3 даже в самой высокой протестированной концентрации. В Таблице 14 и Таблице 15 подытожены соответственно проценты аннексин-в-положительных клеток JJN-3 и

проценты лизиса клеток JJN-3, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами.

Детекцию ЛДГ также проводят после 20-24 ч или 48 ч инкубации при 37 °С, 5% CO₂. Высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней JJN-3 MM в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ нанесен на график в зависимости от концентраций биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC50 измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли, как концентрацию антитела TCB, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ.

Таблица 14. Перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами клеток JJN-3 с низкой экспрессией BCMA, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами: процент содержание аннексин-V-положительных клеток

Эксперимент 1							
Аннексин-V-положительные клетки JJN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/ анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	16,78	10,21	9,12	11,11	11,36	8,14	9,6
42-TCBcv	24,83	16,84	8,62	12,3	11,9	/	9,6
22-TCBcv	22,95	26,15	12,48	13,29	9,3	12,48	9,6
Контрольное TCB	8,84	/	/	/	/	/	/

Эксперимент 2							
Аннексин-V-положительные клетки JJN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/ анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	22,86	17,53	16,5	15,94	14,32	13,07	10,74
42-TCBcv	26,88	21,68	14,42	13,6	13,47	12,75	10,74
22-TCBcv	29,72	26,97	18,35	15,94	15	14,8	10,74
Контрольное TCB	12,82	/	/	/	/	/	/

Таблица 15. Перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами клеток JJN-3 с низкой экспрессией BCMA, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами: процент лизиса JJN-3 клеток

Эксперимент 1							
Лизис клеток JJN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/ анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	70,30	26,66	18,43	41,88	24,42	- 14,45	0,00
42-TCBcv	92,92	84,02	41,87	38,96	40,29	/	0,00
22-TCBcv	88,02	90,54	56,26	73,56	-4,29	26,28	0,00
Контрольное TCB	-6,55	/	/	/	/	/	/

Эксперимент 2							
Лизис клеток JJN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/ анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	51,18	25,30	20,12	39,58	-1,88	22,28	0,00
42-TCBcv	90,37	81,12	55,32	39,44	34,94	17,62	0,00
22-TCBcv	91,21	94,12	53,03	41,66	24,36	36,47	0,00
Контрольное TCB	4,18	/	/	/	/	/	/

Пример 12: Экспрессия BCMA в миеломных плазматических клетках костного мозга у пациентов с множественной миеломой

Линии клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес опухолевую мишень, являются очень полезными и практичными инструментами для измерения активности антител TCB в отношении индукции цитотоксичности опухолевых клеток в присутствии Т-лимфоцитов и определения значений EC50, а также для ранжирования молекул TCB. Однако, несмотря на то, что линии миеломных клеток человека легкодоступны и практичны, имейте в виду, что они не воссоздают гетерогенность множественной миеломы, очень сложного заболевания, которое характеризуется значительной гетерогенностью на молекулярном уровне. Кроме

того, линии миеломных клеток не экспрессируют рецептор BCMA с одинаковой интенсивностью и плотностью, так как некоторые клетки экспрессируют BCMA сильнее, чем другие (например, клетки H929 в сравнении с клетками RPMI-8226), и такая гетерогенность на клеточном уровне также может наблюдаться среди разных пациентов. В ходе академического сотрудничества с ключевыми лидерами мнений по поводу множественной миеломы изучалось определение экспрессии и плотности BCMA в образцах пациентов, и оценивались анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела с клиническими образцами пациентов. Аспираты крови и костного мозга собирают у пациентов с множественной миеломой после получения информированного согласия в соответствии с руководящими принципами местного этического комитета и Хельсинкской декларацией.

а) Экспрессия BCMA, обнаруженная с помощью мультипараметрической проточной цитометрии (средняя интенсивность флуоресценции)

Для определения экспрессии рецептора BCMA в миеломных клетках костного мозга иммунофенотипические анализы проводили с использованием свежеизолированных аспиратов цельного костного мозга. Для иммунофенотипического анализа использовали антикоагулированные образцы цельного костного мозга (этилендиаминтетрауксусная кислота), подвергнутые эритроцитарному анализу Кз-ЭДТК. Всего 2×10^6 клеток/пробирка окрашивали, лизировали и затем промывали, используя метод прямой иммунофлуоресценции и многоцветное окрашивание, целью которого была специфическая идентификация и иммунофенотипическое охарактеризование злокачественных плазматических клеток, идентифицированных как CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Затем клетки окрашивали с использованием панели антител, конъюгированных с флуорохромом, включая, по меньшей мере, CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC. Используемые антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния). Собственное APC-конъюгированное антитело к BCMA человека использовали в иммунофенотипических анализах. Сбор данных осуществляли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра

FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных использовалась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). Экспрессия ВСМА измерялась в зависимости от популяции злокачественных плазматических клеток, а средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) определялись и сравнивались среди пациентов с миеломой.

Таблица 16. Экспрессия ВСМА в миеломных плазматических клетках костного мозга пациента, обнаруженная с помощью мультипараметрической проточной цитометрии (средняя интенсивность флуоресценции, СИФ)

№ пациента	СИФ_{ВСМА}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678
P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615

P23	159
-----	-----

б) Определение способности связывать специфические антигены ВСМА (количественный анализ с помощью проточной цитометрии)

Был использован способ Qifikit (Dako) для количественной оценки способности специфического связывания ВСМА (SABC) на клеточной поверхности миеломных плазматических клеток костного мозга пациента. Миеломные плазматические клетки, выделенные из аспиратов цельного костного мозга, окрашивали 50 мкл мышиного анти-человеческий ВСМА IgG (BioLegend кат. № 357502) или мышиного контрольного изотипа IgG2a (BioLegend кат. № 401501), разведенного в буфере FACS (ФСБ, 0,1% BSA) до конечной концентрации 25 мкг/мл (или до концентраций насыщения) и окрашивание проводили в течение 30 мин при 4 °С в темноте. Затем в отдельные лунки добавляли 100 мкл установочных или калибровочных гранул и клетки, а также гранулы дважды промывали буфером FACS. Клетки и гранулы ресуспендировали в 25 мкл буфера FACS, содержащего конъюгированное с флуоресцеином вторичное анти-мышиное антитело (в концентрациях насыщения), предоставленное Qifikit. Клетки и гранулы окрашивали в течение 45 мин при 4 °С в темноте. Клетки промывали один раз и все образцы ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Образцы сразу анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST).

Таблица 17. Специфическая способность связывания антигена (СССА) ВСМА на миеломных плазматических клетках костного мозга пациента, измеренная количественным анализом - проточной цитометрией

№ пациента	СССА _{ВСМА}
P1	н/д
P2	н/д
P3	679
P4	145
P5	957

P6	969
P7	554
P8	4479
P9	350
P10	414
P11	2756
P12	2911
P13	1267
P14	3453
P15	1006
P16	1097
P17	1622
P18	429
P19	1684
P20	383
P21	1602
P22	799
P23	204

Пример 13: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные плазматические клетки костного мозга пациента в присутствии аутологичных инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга индуцированных биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультипараметрическая проточная цитометрия)

Одна из наиболее значимых и критических характеристик *in vitro* во время доклинической оценки кандидатов с множественной миеломой для лечения антителами TCB заключается в том, может ли молекула TCB активировать Т-лимфоциты пациента и индуцировать перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами первичных миеломных плазматических клетках из костного мозга пациентов. Чтобы оценить влияние анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител на индукцию перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга, аспираты цельного костного мозга собирали у пациентов с множественной миеломой в пробирки с ЭДТК, и сразу использовали для анализа

клеточных культур. Соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (отношение Е:Т), присутствующих в образцах цельного костного мозга, определяли и измеряли проточной цитометрией. Вкратце, 200 мкл образцов костного мозга переносили в 96-луночные плашки с глубокими лунками. Разведения анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител и контрольных антител готовили в стерильной среде, и 10 мкл перепарата добавляли в соответствующие лунки до конечных концентраций в диапазоне от 0,1 пМ до 30 нМ. Суспензию костного мозга с антителами смешивают путем осторожного встряхивания, а затем инкубируют при 37 °C, 5% CO₂ в течение 48 часов, герметизируют парафиновой пленкой. После периода инкубации, 20 мкл соответствующего раствора антитела FACS, приготовленного на основе панели антител, включающей CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/ CD45-V450/BCMA-APC/аннексин-V-PerCP-Cy5.5, добавляли в 96-луночную плашку с U-доньями. Антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния), и было использовано собственное APC-конъюгированное антитело к BCMA человека. Затем образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре, собирали и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Клеточную гибель миеломных клеток определяли путем оценки аннексина-V-положительной экспрессии на основе популяций миеломных клеток CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Затем определяли процент гибели миеломных клеток. Процент лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, вызванный специфической концентрацией биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела также определяли путем измерения абсолютного количества аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток при данной концентрации TCB, и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток без TCB; деля на абсолютное количество аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток без TCB. Для подтверждения специфичности биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, экспрессию аннексина-V также измеряли в других типах клеток костного мозга, таких как Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-лимфоциты. Как показано на Фиг. 8, происходил зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических

клеток пациента, тогда как лизис Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-лимфоцитов не наблюдался. Кроме того, контрольное ТСВ, которое связывается только с CD3, но не с ВСМА, не вызывало гибели миеломных плазматических клеток при самых высоких концентрациях антител ТСВ. Как показано в Таблице 18, процент аннексин-V-положительных миеломных клеток костного мозга пациента при самой высокой концентрации (30 нМ) достигал 52,54% и 55,72% для 42-ТСВсv и 22-ТСВсv соответственно по сравнению с 29,31% для 83A10-ТСВсv, приводя к заключению, что 42-ТСВсv и 22-ТСВсv более эффективны, чем 83A10-ТСВсv, для индуцирования гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента.

Таблица 18. Процент аннексин-V-положительных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациента, индуцированный биспецифичными анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами.

Аннексин-V-положительные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	29,31	30,95	23,14	15,74	16,76	13,11
42-TCBcv	52,54	39,87	29,96	10,51	19,6	13,11
22-TCBcv	55,72	51,71	31,01	14,81	14,19	13,11
Контрольное TCB	15,18	10,93	/	/	/	/

В другом исследовании аспиратов костного мозга из 5 разных пациентов с MM процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток определяли путем установки диапазона отображения данных для популяции аннексин-V-отрицательных клеток и наносили на график в зависимости от концентрации биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела. Значения EC50 измеряли и определяли как концентрацию антител TCB, которая приводит к 50% максимально жизнеспособных миеломных плазматических клеток. EMAX (%) определяли как максимум жизнеспособных миеломных плазматических клеток в присутствии соответствующего биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела. 83A10-TCBcv было гораздо менее эффективно в индукции лизиса миеломных плазматических клеток, чем 22-TCBcv и 42-TCBcv в большинстве из пяти образцов-аспиратов костного мозга пациентов с миеломой (Таблица 26; на Фиг. 9 в качестве примера показаны кривые зависимости концентрации для 2 из 5 пациенты). Зависимое от концентрации уменьшение жизнеспособных миеломных клеток наблюдалось в 5/5 образцах из пациентов, обработанных 22-TCBcv или 42-TCBcv, по сравнению с только 1/5 образцов из пациентов для 83A10-TCBcv. В Таблице 19 показано сравнение 83A10-TCBcv с 22-TCBcv и 42-TCBcv, и влияние биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител на жизнеспособность миеломных плазматических клеток костного мозга. Результаты ясно показывают, что в 4/5 образцов из пациентов было меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга с 22-TCBcv и 42-TCBcv (т. е. больше лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга), что продемонстрировано более низкими значениями EMAX (%) для 22-TCBcv и 42-TCBcv по сравнению с 83A10-TCBcv в соответствующих образцах из пациентов. Наблюдали зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в

то же время не наблюдали лизис незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны).

Таблица 19. Значения EMAX (%) в отношении аннексин-V-отрицательных жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациентов в присутствии биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител.

Образец аспирата костного мозга пациента (Исследование 2)	83A10-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
	EMAX (%)		
Пациент 001	100	7,6	22,6
Пациент 003	54,3	38,9	44,6
Пациент 004	100	66,6	53,9
Пациент 006	81,8	65,9	73,5
Пациент 007	81,8	48,6	72,8

В ходе дополнительных исследований новых биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, используемых в данном изобретении, по сравнению с 83A10-TCBcv, семь свежеприготовленных образцов/аспиратов цельного костного мозга пациентов окрашивали магнитными микрогранулами CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS, и собранные фракции с достаточным оставшимся количеством плазматических клеток MM, обычно >4% миеломных плазматических клеток, использовали в дальнейших экспериментах. В 24-луночных плашках, 500000 клеток/луночка инкубировали и культивировали в течение 48 часов. Разведения анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител и контрольного антитела добавляли в соответствующие лунки до конечной концентрации TCB от 0,1 пМ до 10 нМ. Каждая доза была представлена в трех повторностях. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследовали с помощью двойного окрашивания пропидий йодидом/CD138-FITC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Как показано на Фиг. 10, гистограммы показывают средние значения, нормализованные по среднему значению для трех повторностей соответствующего контроля в виде

среды (МС). Для статистического анализа использовался односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста плазматических клеток ММ при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Было также показано максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 нМ) по сравнению со контролем-средой. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Bioconductor 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Как показано на Фиг. 10А-10Г, результаты ясно показывают, что в 7/7 образцах пациентов было меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга с 22-TCVcv и 42-TCVcv (т.е. больше лизиса плазматических клеток миеломы костного мозга) по сравнению с 83A10-TCVcv. Таблица 20 демонстрирует процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациента, обусловленный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, относительно контроля-среды. Таблица 21 показывает значения IMAX10 и IMAX1. Результаты демонстрируют, что 22-TCVcv и 42-TCVcv явно более эффективны, чем 83A10-TCVcv, в индуцировании гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента. Несмотря на специфический лизис плазматических клеток костного мозга (BMPC), индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, и наблюдаемый во всех образцах костного мозга пациентов, микросреда костного мозга (BMME) не была затронута в соответствующих образцах (Фиг. 10Н, изображающая 7 образцов пациентов).

Таблица 20. Относительный процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток, отрицательных на пропидий йодид, из аспиратов костного мозга пациентов, обусловленный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами.

Образец из пациента № 1 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	181,3	106,3	31,3	9,4
42-TCVcv	81,3	15,6	9,4	9,4

22-TCVcv	37,5	6,3	6,3	9,4
Контр. TCB	/	/	/	162,5
Образец из пациента № 2 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	89,5	31,6	5,3	0
42-TCVcv	42,1	10,5	0	0
22-TCVcv	15,8	5,3	0	0
Контр. TCB	/	/	/	94,7
Образец из пациента № 3 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	76,7	35,0	1,7	0
42-TCVcv	13,3	0	0	0
22-TCVcv	3,3	0	0	0
Контр. TCB	/	/	/	86,7
Образец из пациента № 4 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	93,9	51,5	9,1	6,1
42-TCVcv	9,1	0	0	0
22-TCVcv	15,2	15,2	0	0
Контр. TCB	/	/	/	127,3
Образец из пациента № 5 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	100	91,4	62,9	20,0
42-TCVcv	71,4	34,3	22,9	11,4
22-TCVcv	20,0	22,9	14,3	11,4
Контр. TCB	/	/	/	85,7
Образец из пациента № 6 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	55,6	22,2	6,7	4,4
42-TCVcv	35,6	6,7	4,4	4,4
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2

Контр. ТСВ	/	/	/	117,8
Образец из пациента № 7 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифичных анти- ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	84,4	82,6	46,8	19,3
42-TCVcv	67,0	33,9	12,8	5,5
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2
Контр. ТСВ	/	/	/	106,4

Таблица 21. Значения IMAХ10 и IMAХ1 в отношении максимального ингибирования роста плазматических клеток ММ при 10 нМ IMAХ10 и ингибирования при 1 нМ IMAХ1 исходя из количества пропидий йодид-отрицательных жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациентов в присутствии биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител.

Образец пациента №	83A10-TCBcv		42-TCBcv		22-TCBcv		Контр . TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	90,6	68,8	90,6	90,6	90,6	93,8	-62,5
3	100	94,7	100	100	100	100	5,3
4	100	98,3	100	100	100	100	13,3
5	93,9	90,9	100	100	100	100	-27,3
6	80,0	37,1	88,6	77,1	88,6	85,7	14,3
7	95,6	93,3	95,6	95,6	97,8	91,1	-17,8
8	80,7	53,2	94,5	87,2	97,2	97,2	-6,4

Пример 14: Активация Т-лимфоцитов костного мозга пациента, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультипараметрическая проточная цитометрия)

Чтобы оценить, вызывают ли анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов пациентов с миеломой (т. е. инфильтрированных Т-лимфоцитов (MIL) костного мозга), образцы из соответствующих обработанных, необработанных и контрольных групп после 48 ч инкубации также окрашивали раствором антитела FACS, приготовленным на основе панели антител, включающей в себя восемь маркеров: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. Затем образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре, собирали и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Активацию Т-лимфоцитов определяли путем оценивания CD25, CD69 и/или HLA-DR-положительной экспрессии, устанавливая диапазон отображения данных для популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Затем были измерены проценты активации Т-лимфоцитов. На Фиг. 11 показано зависимое от концентрации повышение экспрессии CD69 и CD25 на инфильтрированных в костный мозг CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах из пациентов с множественной миеломой. Таблица 22 подытоживает увеличение экспрессии CD69 и CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, индуцированной анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами; данные из одного пациента.

Таблица 22: Т-лимфоцитарная активация аутологичных Т-лимфоцитов пациента с миеломой, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами в присутствии миеломных плазматических клеток костного мозга пациента

CD69+ / CD4 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	21,8	14,93	1,80	0,93	1,02	0,85
42-TCBcv	29,6	24,8	1,90	1,57	0,94	0,85
22-TCBcv	34,99	30,72	3,62	1,69	2,31	0,85
Контрольное TCB	0,7	0,62	/	/	/	/
CD69+ / CD8 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	25,50	22,07	8,330	5,60	5,14	5,30
42-TCBcv	23,61	24,22	11,125	9,26	6,28	5,30
22-TCBcv	25,48	28,14	11,460	6,64	14,08	5,30
Контрольное TCB	5,71	4,93	/	/	/	/
CD25+ / CD4 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	17,47	12,86	5,18	4,58	4,07	7,5
42-TCBcv	8,65	7,42	3,51	2,71	2,81	7,5
22-TCBcv	12,34	11,52	5,23	4,89	4,90	7,5
Контрольное TCB	6,90	6,50	/	/	/	/
CD25+ / CD8 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	9,79	6,560	0,42	0,13	0,12	0,12
42-TCBcv	2,20	2,231	0,42	0,14	0,08	0,12
22-TCBcv	3,57	4,110	0,65	0,10	0,08	0,12
Контрольное TCB	0,09	0,100	/	/	/	/

Пример 15: Усиленная Т-лимфоцитарная функция (выработка цитокинов) Т-лимфоцитов костного мозга пациента, индуцированная биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультиплексный иммуноанализ на основе гранул/проточная цитометрия)

Чтобы оценить, индуцируют ли анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (83A10-TCBcv, 22-TCBcv и 42-TCBcv) Т-лимфоцитарную активацию и усиление функции инфильтрирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов костного мозга пациентов с

миеломой, супернатант собирали из культуры соответствующих обработанных, необработанных и контрольных групп после 48 ч инкубации и измеряли содержание цитокинов и сериновых протеаз. Цитокиновый анализ на гранулах (CBA) проводили на многоцветном проточном цитометре в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II Th1/Th2 цитокинов человека (BD кат. № 551809), либо комбинацию следующих наборов CBA Flex: гранзим В человека (BD кат. № 560304), набор Flex ИНФ-γ человека (BD кат. № 558269), набор Flex ФНО-α человека (BD кат. № 558273), набор Flex ИЛ-10 человека (BD кат. № 558274), набор Flex ИЛ-6 человека (BD кат. № 558276), набор Flex ИЛ-4 человека (BD кат. № 558272), набор Flex ИЛ-2 человека (BD кат. № 558270).

Пример 16: Фармакокинетическое/фармакодинамическое (ФК/ФД) исследование у яванских макак

Очевидное преимущество, которое может иметь анти-BCMA/анти-CD3 TCB_{scv} антитело по сравнению с другими биспецифичными антителами, такими как (scFV)₂ (например, BCMAxCD3, биспецифичный вовлекающий активатор Т-лимфоцитов BiTE®, как описано в WO2013072415 и WO2013072406), заключается в значительно более длительном периоде полужизни/более низком клиренсе *in vivo*, который может позволить введение два раза или один раз в неделю внутривенно или подкожно по сравнению с очень коротким периодом полужизни (scFV)₂ (например, от 1 до 4 часов), требующий лечения с помощью насоса, носимого пациентами от нескольких недель до нескольких месяцев (Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8). Введение два раза или один раз в неделю было бы гораздо более удобным для пациентов, а также намного менее рискованным (например, отказ насоса, проблемы с катетером и т. д.).

а) Для проверки периода полужизни/клиренса анти-BCMA/анти-CD3 83A10-TCB_{scv} антитела *in vivo*, фармакокинетические (ФК) фармакодинамические (ФД) исследования однократной дозы биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (83A10-TCB_{scv}, 22-TCB_{scv} и 42-TCB_{scv}) проводили в AAALAC-аккредитованном CRO. Биологически наивные взрослые яванские макаки в возрасте около двух лет и весом около 3 кг были акклиматизированы в течение не меньше чем 40 дней и отобраны исходя из массы тела, клинических наблюдений и клинических патологических исследований. Животных идентифицировали по

индивидуальным татуировкам и карточкам клеток с цветовой кодировкой. Все процедуры с животными (включая содержание, наблюдение за состоянием здоровья, ограниченное содержания, дозирование и т. д.) и рассмотрение этической приемлемости проводились в соответствии с действующим законодательством страны, обеспечивающим соблюдение Директивы о защите животных, используемых в биомедицинских исследованиях. Животные были случайным образом отнесены к группе лечения на основании самой последней массы тела до тестирования. После исключения животных с недопустимыми результатами предварительных обследований, использовалась компьютерная программа, включенная в систему Pristima®, предназначенная для достижения баланса в отношении предтестовой массы тела, чтобы исключить животных из обеих крайних значений массы тела и рандомизировать оставшихся животных в группу лечения. Животных распределяли по трем группам лечения 83A10-TCVcv ($n = 2$ животных, т. е. 1 самка и 1 самец в группе) в количестве 0,003; 0,03; и 0,3 мг/кг. Животные получили одну в/в инъекцию 83A10-TCVcv, и собирали через периферическую вену по меньшей мере 0,8 мл крови в виде образцов в каждый момент времени для оценки ФК в соответствии со следующим графиком и процедурами сбора: До введения дозы, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после дозирования. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4 °C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой в соответствии с следующим графиком сбора: до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 минут при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4 °C). Полученный костный мозг (около 1 мл) хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценку данных ФК. Стандартный не компартментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на Фиг. 12 и в Таблице 23,

сывороточные концентрации 83A10-TCBcv измеряли с помощью ИФА из образцов сыворотки, собранных в разные моменты времени после в/в инъекции. В Таблице 24 показаны концентрации 83A10-TCBcv в костном мозге, измеренные ИФА для каждой группы лечения (BLQ означает уровень ниже уровня количественного определения).

Некоторая информация, относящаяся к возможному клиническому применению биспецифичного антитела, может быть взята из Фиг. 12, Таблицы 23 и Таблицы 24:

- В аспиратах костного мозга из пациентов с ММ концентрации TCB 1 нМ или 10 нМ, используемые в данном изобретении, индуцируют значительную или даже полную гибель плазматических клеток ММ; в дозе 0,03 мг/кг в интервале от инъекции до 168 часов (7 дней) были достигнуты концентрации в плазме между примерно 1 нМ и 4 нМ, показывая, что терапия один раз в неделю с дозами примерно 0,03 мг/кг является вполне возможной (200 нг/мл соответствует примерно 1 нМ)
- Фиг. 12 показывает, что в исследуемом диапазоне доз ФК в значительной степени является линейной от дозы; это означает, что концентрации пропорциональны дозе; полезное свойство в клинической терапии
- ММ - это заболевание, в основном локализующееся в костном мозге; Концентрации 83A10-TCBcv, обнаруженные в костном мозге, близки к сывороточным концентрациям (Таблица 24), например через 96 ч после инъекции концентрации в костном мозге составляли примерно 1 и 2 нМ; это концентрации TCB, используемые в данном изобретении, при которых наблюдается значительное уничтожение плазматических клеток ММ в аспиратах костного мозга, только что взятых у пациентов ММ; снова демонстрируется возможность удобных интервалов дозирования, например, раз в неделю
- Между 24 и 504 часами после инъекции выведение является в основном первого порядка с периодом полужизни примерно от 6 до 8 дней, снова показывая возможность для дозирования, например, раз в неделю

Таблица 23. Сывороточные концентрации 83A10-TCBcv после в/в лечения у яванских макаков

83A10-TCBcv						
Конц. (нг/мл)	0,003 мг/кг в/в		0,03 мг/кг в/в		0,3 мг/кг в/в	
	A	B	C	D	E	F

До дозирования	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30 мин	75,69	74,99	668,66	796,54	17207,20	14943,95
90 мин	70,92	74,56	951,81	628,72	12831,54	16248,97
180 мин	76,54	62,55	981,42	722,27	10653,28	6824,72
7 ч	53,17	77,39	700,67	972,38	8204,77	4560,36
24 ч	33,16	50,41	358,90	532,11	4609,28	4127,41
48 ч	26,05	37,40	279,80	433,30	3546,09	2700,43
96 ч	17,28	19,52	226,01	429,80	1959,96	2006,92
168 ч	17,33	15,87	55,58	365,67	1918,06	1382,57
336 ч	11,21	4,43	102,94	153,54	1102,96	773,55
504 ч	4,33	BLQ	43,99	130,14	952,03	377,04

Таблица 24. Концентрации 83A10-TCBcv в костном мозге после однократного в/в введения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	0,003 мг/кг		0,03 мг/кг		0,3 мг/кг	
	A	B	C	D	E	F
До дозирования	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96 ч	25,07	37,15	179,87	469,08	3432,54	2674,70
336 ч	9,92	6,90	59,39	47,22	1987,48	850,87

Фармакодинамические (ФД) измерения: Образцы крови (моменты времени: до введения дозы, через 24, 48, 96, 168, 336, 504 часа после введения дозы) и образцы костного мозга (моменты времени: до введения дозы, через 96 и 336 часов после введения дозы) собирали в пробирки, содержащие 7,5% КЗ ЭДТК для оценки ФД с помощью проточной цитометрии, чтобы оценить эффект 83A10-TCBcv, предоставляемого в/в в виде однократной дозы, на плазматические клетки крови и костного мозга, В-лимфоциты и Т-лимфоциты. Был применен способ прямого иммунофлуоресцентного окрашивания «лизис и промывка» поверхностных маркеров. Вкратце, 100 мкл крови или костного мозга инкубировали с двумя смесями антител, включая CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 или CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8 в темноте в течение 30 минут при +4°C. Для лизиса эритроцитов к образцу добавляли 2 мл лизирующего буферного раствора и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки собирали центрифугированием и промывали окрашивающим буфером (ФСБ 2% фетальная

бычья сыворотка). Окрашенные образцы хранили в холодильнике, защищали от света до обнаружения в цитометре в тот же день. Сбор данных FACS выполняли с помощью проточного цитометра Becton Dickinson, оснащенного 488 и 635 лазерными линиями, BD FACS Canto II. Программное обеспечение BD FACSDiva использовалось для сбора и анализа данных. Подсчет абсолютного числа клеток проводили с двойной платформой, исходя из подсчета WBC, полученном гематологическим анализатором (ADVIA™ 120, Siemens). Как показано на Фиг. 13, перераспределение периферических Т-лимфоцитов наблюдалось у всех животных, получавших однократную внутривенную дозу 83A10-TCBcv, что отображено уменьшением количества циркулирующих Т-лимфоцитов. Как показано на Фиг. 14А, уже через 24 ч после обработки с помощью 83A10-TCBcv 0,3 мг/кг наблюдалось снижение количества плазматических клеток крови (BCMA-положительных клеток) у животных, получавших лечение, в то же время не наблюдали снижения общего количества В-лимфоцитов (BCMA-отрицательные клетки). На Фиг. 14b показана кинетика уменьшения плазматических клеток в крови после обработки 0,3 мг/кг 83A10-TCBcv у яванских макаков.

Образцы крови также обрабатывали для сбора плазмы для анализа цитокинов (ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α и ИНФ-γ) в соответствии со следующей схемой сбора: до введения дозы, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168 ч после введения дозы. Образцы крови помещали в пластиковые пробирки, удерживали в бане с ледяной водой, затем центрифугировали (по меньшей мере, 10 мин, 1200 г, +4° С). Полученную плазму хранили непосредственно при -80 °С до анализа. Анализ цитокинов проводили с помощью мультиплексного иммуноанализа цитокинов на основе гранул Multiplex (Luminex Technology). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad): использовалась пятипараметрическая модель логистической регрессии (5PL).

b) В дополнительном исследовании, яванских макаков обрабатывали 42-TCBcv или 22-TCBcv. Животные (n = 2 в группе) получали однократную в/в (0,01; 0,1; 1,0 мг/кг) или п/к (0,01 и 0,1 мг/кг) инъекцию 42-TCBcv или однократную в/в инъекцию 22-TCBcv (0,1 мг/кг). Образцы крови и костного мозга отбирали в моменты времени в соответствии с установленным графиком сбора и обрабатывали соответствующим

образом для измерения ФК и ФД (иммунофенотипирование и продуцирование цитокинов).

Животные получали одну в/в или п/к инъекцию 42-ТСВсв или 22-ТСВсв (только в/в) и образцы крови в определенный момент времени собирали через периферическую вену для оценки ФК в соответствии со следующим графиком и процедурами сбора: до введения дозы, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения дозы. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4 °C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой в соответствии с следующим графиком сбора: до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 минут при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4 °C). Полученный костный мозг (около 1 мл) хранили непосредственно при -80 °C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценивание ФК данных. Стандартный не компартментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на Фиг. 19 и в Таблице 24A-D, концентрации 42-ТСВсв измеряли с помощью ИФА образцов сыворотки и образцов костного мозга, собранных в разные моменты времени после в/в или п/к инъекции. Диапазон эффективных концентраций 42-ТСВсв в аспиратах костного мозга пациентов с множественной миеломой составляет от 10 пМ до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ. BLQ, ниже уровня количественного определения; н/и, неокончательное измерение.

Таблица 24А. Сывороточные концентрации 42-ТСВсв после в/в лечения у яванских макак

42-ТСВсв						
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг в/в		0,1 мг/кг в/в		1,0 мг/кг в/в	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки

До дозирования	BLQ	BLQ	н/и	BLQ	BLQ	BLQ
30 мин	468,57	613,44	4720,33	4506,64	41939,31	32677,23
90 мин	333,09	427,16	4284,66	3214,61	30889,73	103925,73
180 мин	392,37	422,36	4336,89	2865,36	29201,69	36157,78
7 ч	421,96	356,34	4028,47	3070,84	25064,81	29962,62
24 ч	242,64	305,74	2996,24	2321,66	19365,86	23656,65
48 ч	н/и	192,97	2595,62	1781,91	20539,59	13523,68
96 ч	128,50	148,02	2153,34	1277,02	13147,09	12755,58
168 ч	51,13	72,64	1388,24	948,31	6189,79	3952,05
336 ч	27,68	13,03	195,51	190,87	5337,85	54,15
504 ч	18,17	8,04	275,93	13,96	3678,69	37,88

Таблица 24В. Концентрации 42-TCBcv в костном мозге после однократного в/в введения у яванских макак

42-TCBcv						
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг в/в		0,1 мг/кг в/в		1,0 мг/кг в/в	
	Самки	Самцы	Самки	Самки	Самцы	Самки
До дозирования	BLQ	BLQ	406,99	BLQ	BLQ	BLQ
96 ч	54,39	130,03	956,56	1022,87	4089,88	4339,33
336 ч	27,23	18,49	227,20	170,34	3705,74	62,44

Таблица 24С. Сывороточные концентрации 42-ТСВсv после п/к лечения у яванских макак

42-ТСВсv				
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг п/к		0,1 мг/кг п/к	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
До дозирования	4,76	12,41	BLQ	BLQ
30 мин	8,25	12,51	25,11	14,62
90 мин	16,38	22,71	140,73	145,39
180 мин	23,75	48,51	334,95	269,66
7 ч	37,46	63,48	836,86	565,10
24 ч	68,15	115,31	2100,42	904,22
48 ч	116,63	118,03	1956,60	1111,06
96 ч	150,77	120,62	1810,13	1817,52
168 ч	106,28	98,64	1192,65	1653,26
336 ч	67,02	46,21	482,39	571,04
504 ч	25,69	31,99	4,08	83,91

Таблица 24D. Концентрации 42-ТСВсv в костном мозге после однократного п/к введения у яванских макак

42-ТСВсv				
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг п/к		0,1 мг/кг п/к	
	Самки	Самцы	Самки	Самки
До дозирования			BLQ	BLQ
	5,59	10,70		
96 ч	109,88	73,93	1064,66	1066,79
336 ч	29,35	48,78	518,40	906,48

Результаты из Таблиц 24А и 24С показывают привлекательный профиль сывороточной концентрации, подходящий для лечения один раз в неделю или даже один раз в две недели с помощью 42-ТСВсv. Была определена площадь под кривой (AUC) для сывороточных концентраций после в/в и п/к введений, сравнение значений AUC показало высокую биодоступность, близкую к 100%, при п/к инъекции 42-ТСВсv. Кроме того, результаты показывают, что концентрация 42-ТСВсv в костном мозге весьма подобна концентрации 42-ТСВсv в сыворотке. Концентрации 42-ТСВсv в сыворотке могут хорошо отображать концентрации 42-ТСВсv, доступные

в костном мозге, то есть в основном месте, где образуются миеломные опухолевые клетки.

Фармакодинамические (ФД) измерения представляют собой ценную информацию, подкрепляющую измерения ФК. Были выполнены дополнительные ФД параметры. CD20⁺ В лимфоциты яванского макака, полученные из крови, также экспрессируют ВСМА на клеточной поверхности и встречаются значительно чаще (более высокое абсолютное число), чем плазматические клетки в крови. Деплетирование В-лимфоцитов крови использовали в качестве надежного фармакодинамического эффекта анти-ВСМА/анти-CD3 TCBcv антител и для сравнения эффективности *in vivo* между 83A10-TCBcv, 42-TCBcv и 22-TCBcv. Абсолютное количество В-лимфоцитов рассчитывали на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета лейкоцитов, полученного с помощью гематологического анализатора, и измеренных в следующие моменты времени: до введения дозы, через 24 часа, 48 часов, 96 часов и 196 часов после 10-минутной в/в инфузии. Процент деплетирования В-лимфоцитов рассчитывали следующим образом:

$$= \frac{[\text{абсолютное количество В-лимфоцитов до введения дозы}] - [\text{абсолютное количество В-лимфоцитов в момент времени}]}{[\text{абсолютное количество В-лимфоцитов до введения дозы}]} * 100$$

Таблица 24Е: Фармакодинамические эффекты анти-ВСМА/анти-CD3 TCBcv антител: Деплетирование В-лимфоцитов

Время после в/в инъекции (часы)	Деплетирование В-лимфоцитов относительно количества до введения дозы (%)		
	83A10-TCBcv 0,3 мг/кг (n = 2)	42-TCBcv 0,1 мг/кг (n=2)	22-TCBcv 0,1 мг/кг (n=2)
24 ч	19,9 ± 0,21	91,4 ± 3,8	77,8 ± 3,7
48 ч	11,9 ± 17,6	88,8 ± 3,9	61,5 ± 9,8
96 ч	5,0 ± 10,8	93,0 ± 7,2	89,2 ± 4,8
168 ч	-0,23 ± 61,4	96,6 ± 3,5	91,9 ± 3,9

42-TCBcv и 22-TCBcv более эффективны, чем 83A10-TCBcv, для индукции деплетирования ВСМА-экспрессирующих В-лимфоцитов у яванских макаков после однократной в/в инъекции (смотрите Таблицу 24Е). Поскольку данные три молекулы имеют одинаковую молекулярную структуру и связыватель CD3, различие в

эффективности у яванских макак может быть в основном связано с соответствующим антителом к ВСМА.

Чтобы подтвердить, что деплетирование ВСМА-экспрессирующих В-лимфоцитов у яванских макак после в/в инъекции является результатом механистического фармакодинамического эффекта анти-ВСМА/анти-CD3 TCBcv антител, было измерено увеличение количества активированных CD8⁺ цитотоксичных Т-лимфоцитов (т. е. эффекторных клеток) в костном мозге, обогащенном ВСМА-положительными клетками (т. е. клетками-мишенями) через 4 дня (96 ч) и 3 недели (336 ч) после в/в инъекции. Абсолютное количество CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-лимфоцитов было рассчитано на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета лейкоцитов, выполненного с помощью гематологического анализатора.

Таблица 24F: Фармакодинамические эффекты анти-ВСМА/анти-CD3 TCBcv антител: Увеличение количества CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-лимфоцитов

Время после в/в инъекции (часы)	Увеличение количества CD8 ⁺ CD25 ⁺ активированных Т-лимфоцитов относительно количества до введения дозы (%)		
	83A10-TCBcv 0,3 мг/кг (n = 2)	42-TCBcv 0,1 мг/кг (n=2)	22-TCBcv 0,1 мг/кг (n=2)
96 ч	284 ± 244 %	585 ± 496 %	1449 ± 1715 %
336 ч	-0,9 ± 1,3%	110 ± 187 %	-6,6 ± 45,3 %

42-TCBcv и 22-TCBcv более эффективны, чем 83A10-TCBcv, для индукции активации Т-лимфоцитов у яванских макак после однократной в/в инъекции (смотрите Таблицу 24F). Поскольку данные три молекулы имеют одинаковую молекулярную структуру и связыватель CD3, различие в фармакодинамическом эффекте у яванских макак может быть в основном связано с соответствующим антителом к ВСМА. Результаты показывают, что деплетирование ВСМА-положительных В-лимфоцитов в костном мозге и в крови, скорее всего, является результатом активации цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцированной анти-ВСМА/анти-CD3 TCBcv антителами.

Пример 17: Противоопухолевая активность, индуцированная биспецифичным анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителом в модели ксенотрансплантата

миеломы H929 человека с использованием гуманизированных по МКПК мышей NOG.

С длительным периодом полужизни Fc-содержащие анти-BCMA/анти-CD3 TCBscv антитела могут быть более эффективными, чем биспецифичные антитела на основе (scFv)₂, такие как BCMA50-BiTE®, вводимые в эквимольных дозах, по схеме один раз в неделю. Эффект *in vivo* 83A10-TCBscv и BCMA50-BiTE® (как описано в WO2013072415 и WO2013072406) сравнивался и оценивался в модели ксенотрансплантата миеломы H929 человека у гуманизированных по МКПК мышей NOG. Мыши NOG являются подходящими моделями гуманизированных мышей, поскольку у них полностью отсутствуют иммунные клетки, включая резидентную популяцию NK-лимфоцитов, и поэтому они более восприимчивы к приживлению опухолевых человеческих ксеногенных клеток (Ito et al. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 324: 53-76). Вкратце, в День 0 (D0) исследования 5×10^6 человеческих миеломных клеток линии NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 50:50 матригеля (BD Biosciences, France), вводили подкожно (п/к) в правый дорсальный бок иммунодефицитных мышинных самок NOD/Shi-scid IL2rgamma(нуль) (NOG) в возрасте 8-10 недель (Taconic, Ry, Denmark). За 24-72 часа до п/к имплантации опухолевых клеток H929 все мыши получали облучение всего тела γ -источником (1,44 Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Бретеньер, Франция). На 15-й день (D15) мыши NOG получали однократную внутривентральную (в/б) инъекцию 2×10^7 человеческих МКПК (в 500 мкл ФСБ 1X pH 7,4). Охарактеризование МКПК человека было выполнено иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Затем мышей внимательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля (n = 9/группа) с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Франция) и проводили статистический анализ (дисперсионный анализ) для проверки однородности между группами. Лечение антителами начинали в День 19 (D19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929, когда объем опухоли достигал по меньшей мере 100-150 мм³ у всех мышей, со средним объемом опухоли 300 ± 161 мм³ для контрольной группы, обработанной носителем, 315 ± 148 мм³ для группы, обработанной 2,6 нМ/кг контрольного TCB, 293 ± 135 мм³ для группы 2,6 нМ/кг 83A10-TCBscv и 307 ± 138 мм³ для группы 2,6 нМ/кг BCMA50-(scFv)₂ (BCMA50-BiTE®). Схема

лечения антителом ТСВ основывалась на фармакокинетических результатах, ранее полученных с помощью 83A10-ТСВ_{scv}, и состояла из в/в введения один раз в неделю в течение вплоть до 3 недель (т. е. всего 3 инъекции антитела ТСВ). Через четыре дня после восполнения мышей-хозяев человеческими МКПК (Д19) вводили первую дозу анти-BCMA/анти-CD3 83A10-ТСВ_{scv} антитела (2,6 нМ/кг, соответственно, 0,5 мг/кг) путем инъекции в хвостовую вену. Образцы крови отбирали путем пункции яремной/нижнечелюстной вены (под анестезией) за 1 ч до каждой обработки, за 2 ч до второй обработки и по окончании у мышей из всех групп, получавших 83A10-ТСВ_{scv} и контрольное ТСВ_{scv}. Образцы крови немедленно переносили в пробирки, содержащие активатор свертывания (пробирки Т MG, вишнево-красный верх, Sariject®, Tegimo®). Пробирки оставляли при комнатной температуре на 30 мин, чтобы обеспечить свертывание. Затем пробирки центрифугировали при 1300 g в течение 5 минут для отделения сгустка от сыворотки. Готовили аликвоты сыворотки, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C до дополнительного анализа. Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. Процент роста опухоли, обозначенный как РО (%), определяли путем вычисления $PO (\%) = 100 \times (\text{медианное значение ОО анализируемой группы}) / (\text{медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель})$. По этическим причинам мышей умерщвляли, когда ОО достигал по меньшей мере 2000 мм³. На Фиг. 15 показан ОО для каждой отдельной мыши в экспериментальной группе: (А) контрольные группы, включающие контроль в виде носителя (цельная линия) и контрольного ТСВ (пунктирная линия), (В) группа 83A10-ТСВ_{scv} (2,6 нМ/кг) и (С) BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг). В группе 83A10-ТСВ_{scv} (2,6 нМ/кг) у 6 из 9 мышей (67%) опухоль регрессировала даже ниже ОО, записанного в Д19, то есть первое лечение ТСВ и регрессия опухоли сохранялись до прекращения исследования. Три мыши в группе, обработанной 83A10-ТСВ_{scv} (2,6 нМ/кг), которые не продемонстрировали регрессию опухоли, имели ОО, составляющие 376, 402 и 522 мм³ соответственно в Д19. Напротив, ни у одной из 9 мышей (0%), получавших эквимоллярную дозу BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг) по схеме один раз в неделю в течение 3 недель, не наблюдали регрессии опухоли в какой-либо момент времени. Таблица 25 показывает прогрессирование объемов опухоли с течением времени во всех экспериментальных группах. Процент роста опухоли рассчитывали для Д19-Д43 и

сравнивали между группой 83A10-TCBcv (2,6 нМ/кг) и ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) (Фиг. 16). Результаты демонстрируют что РО (%) постепенно и значительно снижался в группе 83A10-TCBcv (2,6 нМ/кг), а также РО (%) всегда был ниже по сравнению с ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг). В Таблице 26 показан медианный объем опухоли (ОО) и процент роста опухоли (РО (%)) в дни с 19 по 43. Общие результаты четко продемонстрировали, что 83A10-TCBcv превосходит ВСМА50-BiTE® по индукции противоопухолевой активности *in vivo*, когда лечение назначается в эквимольной дозе один раз в неделю в течение 3 недель.

Таблица 25. Прогрессирование объемов опухоли с течением времени у мышей из контрольной группы носителя и мышей, получавших эквимольные дозы контрольного TCB, 83A10-TCBcv и ВСМА50-(scFv)₂ (ВСМА50-BiTE®)

Объем опухоли (мм ³)	Группа А с контролем в виде носителя										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	Среднее	СО
День 5	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
День 8	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
День 12	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
День 15	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
День 19	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
День 23	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
День 27	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
День 30	1870	1129	х	419,2	867	1060	1368	673	1331	1090	450
День 34	х	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
День 37		2140		2043	1309	2017	2394	1267	х	1862	464
День 40		х		х	1592	х	х	1346		1469	174
День 43					1548			1994		1771	314
День 47					х			х			
День 51											

Объем опухоли (мм ³)	Группа В 2,6 нМ/кг контрольного ТСВ										
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	Среднее	СО
День 5	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
День 8	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
День 12	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
День 15	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
День 19	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
День 23	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
День 27	924	1252	232	780	768	1009	915	606	630	791	289
День 30	1191	1714	326	867	1230	1349	1118	817	783	1044	398
День 34	1684	х	592	1466	1660	1954	1765	1180	576	1359	529
День 37	2522		597	1735	1105	х	х	1402	861	1370	691
День 40	х		978	2388	1952			2277	1365	1792	604
День 43			1302	х	х			х	1895	1599	419
День 47			2346						2373	2359	19
День 51			х						х		

Объем опухоли (мм ³)	Группа С 2,6 нМ/кг 83A10-TCBcv										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	Сред- нее	CO
День 5	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
День 8	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
День 12	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
День 15	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
День 19	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
День 23	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210
День 27	1119	376	443	1400	253	253	678	371	1166	673	441
День 30	1607	187	260	1975	88	113	219	191	1590	692	783
День 34	2143	68	100	x	34	54	63	53	2429	618	1033
День 37	x	41	44		43	34	34	35	x	38	5
День 40		64	40		43	38	32	39		43	11
День 43		40	43		33	24	32	25		33	8
День 47		14	21		16	12	19	14		16	3
День 51		15	30		20	20	15	18		20	6

Объем опухоли (мм ³)	Группа D 2,6 нМ/кг BCMA50-(scFv) ₂ (BCMA50-BiTE®)										
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Среднее	CO
День 5	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
День 8	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
День 12	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
День 15	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
День 19	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
День 23	560	483	121	811	665	408	654	457	1115	586	278
День 27	827	879	216	1224	1092	732	886	908	1526	921	359
День 30	1026	1414	227	1476	1373	1256	1210	1228	2433	1294	567
День 34	1368	1855	418	2185	1734	1936	1465	1645	x	1576	535
День 37	1691	2754	599		2542		2102	2062		1958	765
День 40	2764	x	706		x		x	x		1735	1455
День 43	x		807							807	н/д
День 47			x								
День 51											

Таблица 26. Средний объем опухоли (ОО) и процент роста опухоли (РО (%)) в дни 19-43: 83A10-TCBcv по сравнению с BCMA50-BiTE®.

Ингибирование роста опухоли РО _{инг} (%)	Контроль в виде обработки носителем		83A10-TCBcv 2,6 нМ/кг		BCMA50-BiTE® 2,6 нМ/кг		Контрольное TCB 2,6 нМ/кг	
	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)
День 19	327	100	287	87,8	303	92,7	285	87,2
День 23	481	100	395	82,1	560	116,4	461	95,8
День 27	870	100	443	50,9	886	101,8	780	89,7
День 30	1094,5	100	219	20,0	1256	114,8	1118	102,1
День 34	1521	100	65,5	4,3	1689,5	111,1	1563	102,8
День 37	2030	100	38	1,9	2082	102,6	1253,5	61,7
День 40	1469	100	39,5	2,7	1735	118,1	1952	132,9
День 43	1771	100	32,5	1,8	807	45,6	1598,5	90,3
День 47	/	/	15	/	/	/	2359,5	/
День 51	/	/	19	/	/	/	/	/

Пример 19: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на плазматические клетки из мононуклеарных клеток периферической крови или аспиратов костного мозга пациента с плазмоклеточным лейкозом (ПКЛ) в присутствии аутологических Т-лимфоцитов, индуцированных биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии

Плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ) представляет собой лейкозный вариант миеломы, возникающей либо *de novo*, либо из клинически существовавшей множественной миеломы (ММ). Текущие доступные методы лечения довольно ограничены и состоят в основном из комбинаций препаратов для ММ и химиотерапии. До настоящего времени не было зарегистрировано какой-либо терапии для этого чрезвычайно агрессивного и смертельного заболевания. BCMA играет важную роль в выживании нормальных плазматических клеток, и биспецифичные анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела можно использовать для лечения плазмоклеточного лейкоза у пациента, страдающего указанным заболеванием. Свежесобранные

моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) из образцов пациентов с плазмноклеточным лейкозом, содержащих > 80% плазматических клеток при большом количестве лейкоцитов, выделяют с помощью градиента плотности с использованием фиколла или других сопоставимых способов, и инкубируют в течение 24 часов и 48 часов с концентрациями биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител или контрольных антител от 0,1 нМ до 30 нМ при 37 °С в атмосфере увлажненного воздуха. В качестве образцов также могут быть использованы аспираты цельного костного мозга из пациентов с плазмноклеточным лейкозом. Каждая доза проанализирована в трех повторностях. Апоптоз определяют путем окрашивания аннексином/пропидий йодидом всей популяции и CD138-положительных клеток на FACSCalibur с использованием программного обеспечения Diva (BD). Жизнеспособность плазматических клеток и всей популяции МКПК исследуют с помощью пропидий йодида/двойного окрашивания CD138-FITC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Средние значения нормализованы по средним значениям трех повторностей соответствующего контроля в виде среды (MC). Для статистического анализа используется односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста клеток ПКЛ при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Также измеряют максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 или 30 нМ) по сравнению с контролем-средом. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Bioconductor 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Экспрессию BCMA также измеряли на плазматических клетках CD138⁺ МКПК из образцов пациентов с плазмноклеточным лейкозом, а также определяли соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (Е:Т). Как показано на Фиг. 20, результаты четко демонстрируют, что в двух образцах пациентов с плазмноклеточным лейкозом значительно уменьшилось количество жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза в костном мозге с помощью 42-TCBcv (то есть

увеличился лизис клеток плазмноклеточного лейкоза в костном мозге) по сравнению с контролем-средой. Таблица 27 демонстрирует процент максимального ингибирования клеток плазмноклеточного лейкоза из аспиратов костного мозга пациента или периферической крови, индуцированного 10 нМ (IMAX10) и 1 нМ (IMAX1) биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител относительно контроля-среды. Результаты демонстрируют, что 42-TCBcv является очень эффективным средством для индукции гибели клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга пациента. Несмотря на специфический лизис клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга, индуцированный биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, и исследованных образцов костного мозга (пациент 1 ПКЛ), микросреда костного мозга (BMME) не была затронута в соответствующих образцах (данные не показано).

Уничтожение с помощью EM901 злокачественных плазматических клеток у пациентов с ПКЛ является эффективным. Но, по меньшей мере, в одном из двух образцов пациентов, исследованных при самой высокой концентрации 10 нМ, уничтожение составляло только немного выше 50%. Эксперименты с комбинациями EM901 либо с талидомидами, либо с антителами PD-1 или PD-L1, либо с анти-CD38 антителами покажут потенциальную пользу таких комбинаций, например, как более высокий процент (%) уничтожения, например, с 10 нМ или другими концентрациями EM901.

Таблица 27. Значения IMAX10 и IMAX1 в отношении максимального ингибирования роста клеток плазмноклеточного лейкоза при 10 нМ IMAX10 и ингибирования при 1 нМ IMAX1 исходя из количества пропидий йодид-отрицательных жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза из аспиратов костного мозга пациентов в присутствии биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител.

Образец пациента №	42-TCBcv		Контр. TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	99,6	88,2	-2,7
2	~60,0	~40,0	~8,0

Пример 20: Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на плазматические клетки костного мозга пациентов с первичным амилоидозом (амилоидоз AL - амилоидоз с легкоцепочечным амилоидом) в присутствии

аутологичных Т-лимфоцитов, индуцированных биспецифичными анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии

Первичный амилоидоз является редким заболеванием, вызванным нарушением костного мозга, которое обычно поражает людей в возрасте 50-80 лет, причем две трети пациентов являются мужчинами. Первичный амилоидоз выражается в аномальном продуцировании белка антител / иммуноглобулинов плазматическими клетками. При первичном амилоидозе легкие цепи (LC) антитела неправильно свернуты, и в результате чего аномальный LC неправильно свернутый белок формирует амилоид. Эти неправильно свернутые амилоидные белки откладываются в тканях, нервах и органах, или возле них. Поскольку амилоид накапливается в органе, нерве или ткани, он постепенно наносит ущерб и влияет на их функцию. У пациентов с первичным амилоидозом часто поражаются больше чем одним орган. Поскольку BCMA играет существенную роль в выживании нормальных плазматических клеток, является весьма обоснованной оценка влияние биспецифичных анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител на уничтожение плазматических клеток при первичном амилоидозе. Свежеотобранные образцы/аспираты цельного костного мозга пациентов с первичным амилоидозом либо прямо подвергали воздействию анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител, либо окрашивали магнитными микрогранулами CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS, и собранные фракции с достаточным оставшимся количеством плазматических клеток первичного амилоидоза, составляющим обычно >4%, использовали в дополнительных экспериментах. В 24-луночных плашках, 500000 клеток/лунка инкубировали и культивировали в течение 48 часов. Разведения анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител и контрольного антитела добавляли в соответствующие лунки до конечной концентрации TCB от 0,1 пМ до 30 нМ. Каждая доза проанализирована в трех повторностях. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследовали с помощью двойного окрашивания пропидий йодидом/CD138-FITC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Кроме того, комбинации EM901 с талидомидами, или анти-PD-1 антителами, или анти-PD-L1 антителами,

или анти-CD38 антителами, тестировали в тех же экспериментальных условиях. Испытывали различные концентрации EM901, а также партнеров по комбинации. Средние значения нормализованны по средним значениям трех повторностей соответствующего контроля в виде среды (МС). Для статистического анализа используется односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста клеток ПКЛ при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Также измеряют максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 или 30 нМ) по сравнению с контролем-средом. Те же значения также определяются из результатов, полученных для комбинаций, например, максимальное ингибирование, например, 10 нМ EM9091 в присутствии х нМ, например, леналидомида и т. д. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Bioconductor 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Экспрессию ВСМА также измеряли на CD138⁺ плазматических клетках костного мозга из образцов пациентов с первичным амилоидозом, а также определяли соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (Е:Т).

Пример 21: Комбинированное применение биспецифичного анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела с иммунотерапевтическим лекарственным средством

Биспецифичное анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитело (а именно, 83A10-TCBcv или 42-TCBcv) комбинировали с тремя лекарственными средствами, представляющими различные виды иммунотерапии: леналидомидом, анти-PD-1 антителом и анти-CD38 антителом даратумумабом. Клетки H929 MM совместно культивировали с лейкоцитами человека из здоровых доноров (n = 1 или 5) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС, 0,5% гентамицина и 1% L-глутамина при 37 °C в увлажненном 5%-ном CO₂-инкубаторе, и подвергали воздействию субоптимальных концентраций 83A10-TCBcv (10 пМ) (n = 5) или 42-TCBcv (10 пМ) (n = 1) отдельно или в комбинации с леналидомидом (1 мкМ), анти-PD-1 антителом (10) мкг/мл и анти-CD38 антителом даратумумабом (10 мкг/мл). Как показано на Фиг. 21А, комбинирование 83A10-TCBcv с леналидомидом или даратумумабом значительно увеличивало их анти-MM эффективность в 4 и 2,5 раза соответственно. На Фиг. 21В

и в Таблице 28 показан процент лизиса клеток ММ, когда клетки Н929 и лейкоциты из одного здорового донора подвергались воздействию 42-ТСВсв (10 пМ) в комбинации с леналидомидом (1 мкМ), анти-PD-1 антителом (10 мкг/мл) и анти-CD38 антителом даратумумабом (10 мкг/мл) в течение 48 ч культивирования. Комбинирование 42-ТСВсв с леналидомидом или даратумумабом также увеличивало их анти-ММ эффективность в уничтожении клеточных линий ММ.

Таблица 28. Лизис клеток ММ с анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ отдельно или в комбинации с леналидомидом, анти-PD-1 антителом или анти-CD38 антителом даратумумабом: пример с донором 1.

	Донор 1	
Только 42-ТСВсв (10 пМ)	6,74%	
Комбинация с 42-ТСВсв:	без ТСВ	с ТСВ
Даратумумаб (10 мкг/мл)	33,06%	42,29%
леналидомид (1 мкМ)	-1,78%	13,27%
Анти-PD-1	20,26%	23,56%

Пример 22: Комбинированное применение *in vivo* биспецифичного анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела с анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом

Аддитивную или синергетическую комбинацию анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ с антителом, чтобы блокировать путь PD-1/PD-L1 (либо с анти-PD-1 антителом, либо с анти-PD-L1 антителом) и ингибировать нисходящую модуляцию ответов Т-лимфоцитов при взаимодействии PD-L1 с его рецептором PD-1 на Т-лимфоцитах, можно оптимально наблюдать в условиях *in vivo*, таких как модель ксенотрансплантата ММ или мышьяная модель ММ, вместо наблюдения *in vitro*. Вкратце, в День 0 (Д0) исследования 5×10^6 человеческих миеломных клеток линии NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 50:50 матригеля (BD Biosciences, Франция), вводили подкожно (п/к) в правый дорсальный бок иммунодефицитных мышьяных самок NOD/Shi-scid IL2rgamma(нуль) (NOG) в возрасте 8-10 недель (Taconic, Ry, Дания). На 15-й день (Д15) мыши NOG получали однократную внутрибрюшинную (в/б) инъекцию 2×10^7 человеческих МКПК (в 500 мкл ФСБ 1X pH 7,4). Охарактеризование МКПК человека было выполнено иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Мышей затем тщательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля (n = 9/группа) и проводили статистический анализ (дисперсионный анализ) для проверки

однородности между группами. Лечение антителами начинали в День 19 (Д19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929, когда объем опухоли достигал по меньшей мере 100-150 мм³ у всех мышей. Схема лечения антителом TCB основывалась на фармакокинетических результатах, ранее полученных с помощью анти-BCMA/анти-CD3 TCB, и состояла из в/в введения один раз в неделю в течение вплоть до 3 недель (т. е. всего 3 инъекции антитела TCB). Через два-четыре дня после восполнения мышей-хозяев человеческими МКПК (Д19) вводили первую еженедельную дозу только анти-BCMA/анти-CD3 антитела (доза от 0,1 до 0,5 мг/кг) путем инъекции в хвостовую вену, или в комбинации с анти-PD-L1 антителом, также вводимым один раз в неделю (доза от 1 до 10 мг/кг). Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. Процент роста опухоли, обозначенный как РО (%), определяли путем вычисления $PO (\%) = 100 \times (\text{медианное значение ОО анализируемой группы}) / (\text{медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель})$.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ENGMAB SARL

<120> БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К ВСМА И CD3, И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

<130> P48249WO

<150> EP16196874.8

<151> 2016-11-02

<160> 57

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 5

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 1

Thr	Tyr	Ala	Met	Asn
1				5

<210> 2

<211> 19

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15	
Val	Lys	Gly													

<210> 3

<211> 14

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 3

His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5									10

<210> 4

<211> 14

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 4

Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn
1				5									10

<210> 5

<211> 7

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
1				5		

<210> 6

<211> 9
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 6
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 7
<211> 125
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 7
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 109
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 8
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 9
<211> 116
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область VH

<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

<210> 12
<211> 109
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область VL

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
85 90 95
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 109
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область VL Mab22

<400> 13
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
85 90 95
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 109
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область VL Mab42

<400> 14
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu
20 25 30
Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50						55						60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu		
65					70					75					80		
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro		
			85					90						95			
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100				105										

<210> 15
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1H 83A10

<400> 15
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR2H 83A10

<400> 16
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 17
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDRH3

<400> 17
 Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1L 83A10

<400> 18
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
 1 5 10

<210> 19
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR2L 83A10

<400> 19

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDRL3

<400> 20

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10

<210> 21

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1H

<400> 21

Asp Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 22

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2H

<400> 22

Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 23

<211> 13

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1L Mab21

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala Trp
1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2L Mab21

<400> 24
 Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1L Mab22

<400> 25
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp
 1 5 10

<210> 26
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2L Mab22

<400> 26
 Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1L Mab42

<400> 27
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Trp
 1 5 10

<210> 28
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2L Mab42

<400> 28
 His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1H Mab27

<400> 29
 Ser Ala Pro Met Gly
 1 5

<210> 30
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2H Mab27

<400> 30
Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 31
<211> 12
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1L

<400> 31
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2L

<400> 32
His Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3L

<400> 33
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10

<210> 34
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1H Mab33

<400> 34
Thr Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 35
<211> 17

<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2H Mab33

<400> 35
Ala Ile Asn Arg Phe Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 36
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1H Mab39

<400> 36
Gln Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 37
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2H Mab39

<400> 37
Ala Ile Ser Pro Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 38
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH Mab27

<400> 38
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
20 25 30
Pro Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 116
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH Mab33

<400> 39
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Asn
20 25 30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Asn Arg Phe Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 116
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH Mab39

<400> 40
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gln Asn
20 25 30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Pro Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 103
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Домен CH1

<400> 41
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr

			20					25				30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys									
			100												

<210> 42

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен CL

<400> 42

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg
1			5					10						15	
Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
		35					40					45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
			85						90					95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
			100					105							

<210> 43

<211> 103

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CH1 CD3

<400> 43

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1			5					10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys									
			100												

<210> 44

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CL CD3

<400> 44

Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
1				5					10					15	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
		35					40					45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
			85					90						95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
			100					105							

<210> 45

<211> 671

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC с "выступом" 83A10

<400> 45

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130				135					140					
Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165				170						175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195				200						205			
Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
	210					215					220				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu
225					230					235					240
Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
				245					250					255	
Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
			260					265					270		
Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro

230

<211> 671

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> НС с "выступом" Mab21

<400> 49

Glu 1	Val	Gln	Leu	Leu 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Asp	Asn
Ala	Met	Gly 35	Trp	Val	Arg	Gln 40	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly 45	Leu	Glu	Trp	Val
Ser	Ala 50	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly 55	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr 70	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn 75	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu 80	Tyr
Leu	Gln	Met	Asn 85	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Lys	Val 100	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr 105	Trp	Gly	Gln	Gly 110	Thr	Leu	Val
Thr	Val 115	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys 120	Gly	Pro	Ser	Val 125	Phe	Pro	Leu	Ala
Pro	Ser 130	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser 135	Gly	Gly	Thr	Ala 140	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
Val 145	Glu	Asp	Tyr	Phe 150	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val 155	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly 160
Ala	Leu	Thr	Ser 165	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro 170	Ala	Val	Leu	Gln	Ser 175	Ser
Gly	Leu	Tyr 180	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 185	Val	Thr	Val	Pro	Ser 190	Ser	Ser	Leu
Gly	Thr 195	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn 200	Val	Asn	His	Lys	Pro 205	Ser	Asn	Thr
Lys	Val 210	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro 215	Lys	Ser	Cys	Asp 220	Gly	Gly	Gly	Gly
Ser 225	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala 230	Val	Val	Thr	Gln 235	Glu	Pro	Ser	Leu 240
Thr	Val	Ser 245	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu 250	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
Gly	Ala	Val 260	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala 265	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	
Gly	Gln 275	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
Gly	Thr 290	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
Leu 305	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
Ala	Leu	Trp 325	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
Thr	Val	Leu 340	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
Ala	Pro	Ser 355	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
Leu	Val 370	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
Gly 385	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
Ser	Gly	Leu 405	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn

			180					185				190					
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
		195					200					205					
Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
	210					215					220						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		275					280					285					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290					295					300						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
305					310					315					320		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
			325					330						335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro		
		340						345					350				
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val		
		355					360					365					
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
	370					375					380						
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
385					390					395					400		
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp		
			405					410						415			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His		
			420					425					430				
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		435					440					445					

<210> 51

<211> 216

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC Mab21

<400> 51

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
1				5				10						15			
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr		
		20						25					30				
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu		
		35					40					45					
Ile	Glu	His	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser		
	50					55					60						
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu		
65					70				75						80		
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro		
			85					90					95				
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val		
		100						105					110				
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys		
		115					120					125					
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg		
	130					135					140						
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn		
145					150					155					160		
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser		

370		375		380
Gly Ala Leu Thr Ser	Gly Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser		
385	390	395		400
Ser Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser		
	405	410		415
Leu Gly Thr Gln Thr	Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser Asn		
	420	425		430
Thr Lys Val Asp Lys	Lys Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr His		
	435	440		445
Thr Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Glu Ala	Ala Gly Gly Pro Ser Val		
	450	455		460
Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr		
465	470	475		480
Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro Glu		
	485	490		495
Val Lys Phe Asn Trp	Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala Lys		
	500	505		510
Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val Ser		
	515	520		525
Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
	530	535		540
Cys Lys Val Ser Asn	Lys Ala Leu Gly Ala	Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
545	550	555		560
Ser Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	565	570		575
Pro Cys Arg Asp Glu	Leu Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Trp Cys Leu		
	580	585		590
Val Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	595	600		605
Gly Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	610	615		620
Asp Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser Arg		
625	630	635		640
Trp Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu		
	645	650		655
His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
	660	665		670

<210> 53

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC с "отверстием" Mab22

<400> 53

Glu Val Gln Leu Leu	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser	Cys Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Ser Asp Asn
	20	25
Ala Met Gly Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly	Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35	40
Ser Ala Ile Ser Gly	Pro Gly Ser Ser Thr	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85	90
Ala Lys Val Leu Gly	Trp Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr Leu Val
	100	105
Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro	Ser Val Phe Pro Leu Ala
	115	120
Pro Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys Leu
	125	

130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		160
	165	170
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		175
	180	185
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		190
	195	200
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		205
	210	215
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		220
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		240
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		255
	260	265
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		270
	275	280
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		285
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		305
	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		320
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		335
	340	345
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		350
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		365
	370	375
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		380
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		400
	405	410
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		415
	420	425
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		430
	435	440
		445

<210> 54

<211> 216

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC Mab22

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1	5
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	10
	15
	20
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	25
	30
	35
Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	40
	45
	50
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	55
65	60
	65
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro	70
	75
	80
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val	85
	90
	95
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys	100
	105
	110

				85					90					95		
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130					135					140					
Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195				200						205				
Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210					215					220					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260					265					270			
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		275					280					285				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	290					295					300					
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
305					310					315					320	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				325				330						335		
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	
			340					345					350			
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	
		355					360					365				
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	370					375					380					
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
385					390					395					400	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				405					410					415		
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			420					425					430			
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
		435					440					445				

<210> 57

<211> 216

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC Mab42

<400> 57

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1			5					10						15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asp	Glu	
			20					25					30			
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
		35					40					45				
Ile	His	Ser	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50					55					60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	

65					70					75				80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro
				85					90					95
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
			100					105					110	Val
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu
		115					120					125		Lys
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
	130					135					140			Arg
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
145					150					155				Asn
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
			165					170					175	Ser
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
			180					185					190	Lys
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
		195					200					205		Thr
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
	210					215								

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) человека, и вторую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

- i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

2. Биспецифичное антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство для комбинированного применения в лечении множественной миеломы по п. 1, где иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

3. Способ лечения множественной миеломы, характеризующийся введением пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества

- а) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

b) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

причем указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

4. Способ по п. 3, в котором указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

5. Терапевтическая комбинация для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, характеризующаяся тем, что содержит терапевтически эффективное количество

a) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и

b) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

причем указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28.

6. Терапевтическая комбинация по п. 5, в которой указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

7. Изделие, характеризующееся тем, что содержит

а) биспецифичное антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) человека, и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), где указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28 в фармацевтически приемлемом носителе,

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

с) фармацевтически приемлемый носитель и инструкции для введения указанного биспецифичного антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

8. Изделие по п. 7, отличающееся тем, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001,

REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

9. Способ изготовления лекарственного средства, характеризующийся применением терапевтически эффективного количества

а) биспецифичного антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созреваия (BCMA) человека, и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), где указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO:21, область CDR2H SEQ ID NO:22 и область CDR3H SEQ ID NO:17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO:20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы

i) область CDR1L SEQ ID NO:23 и область CDR2L SEQ ID NO:24,

ii) область CDR1L SEQ ID NO:25 и область CDR2L SEQ ID NO:26, или

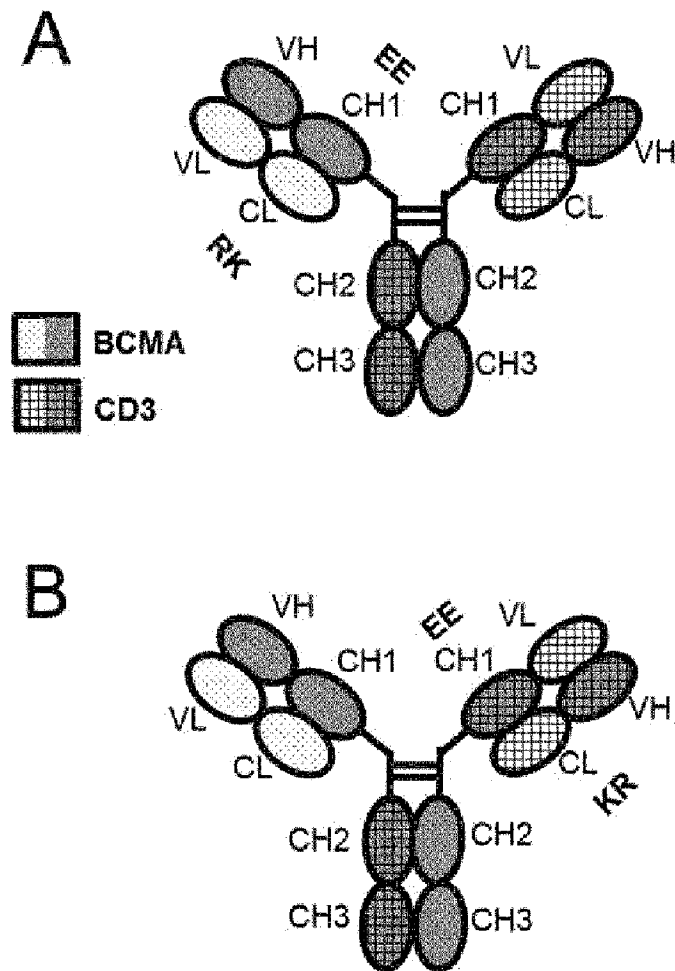
iii) область CDR1L SEQ ID NO:27 и область CDR2L SEQ ID NO:28,

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

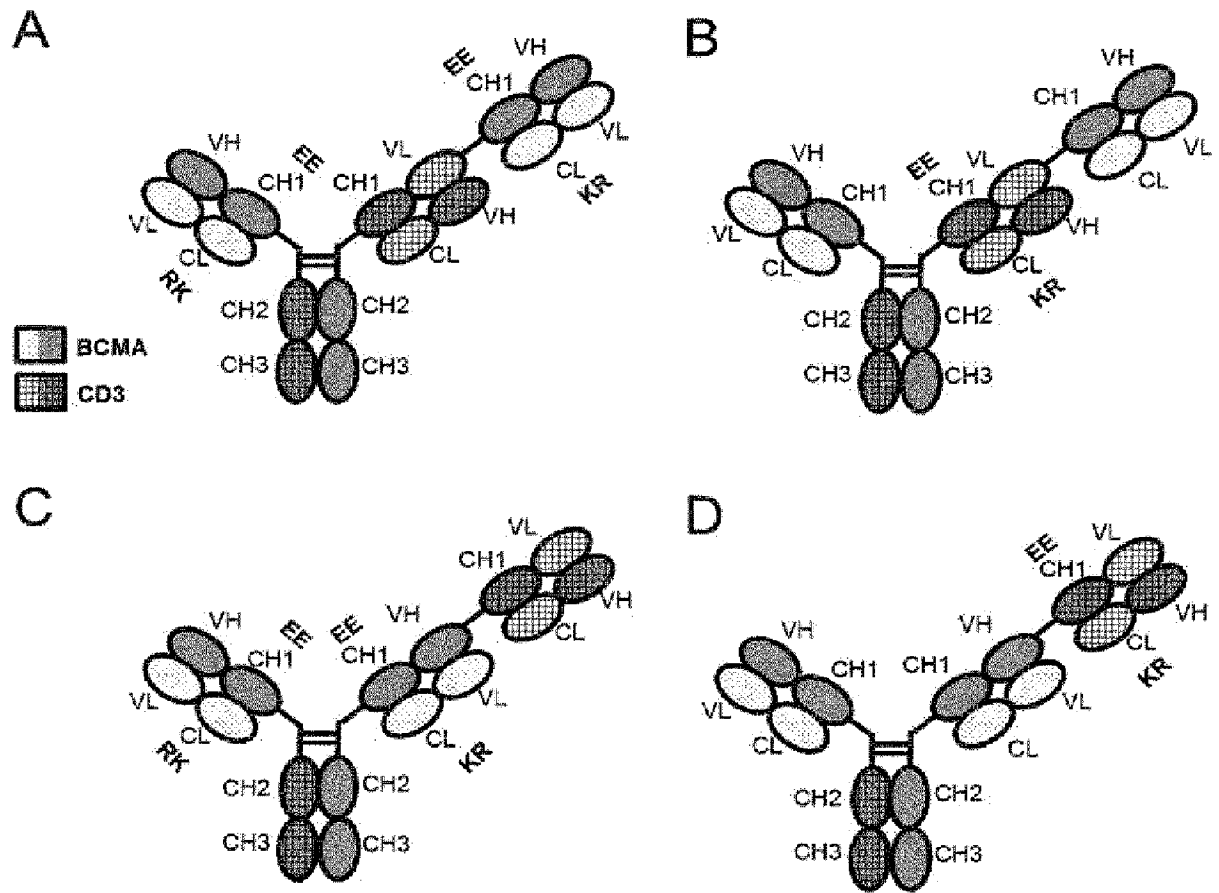
с) объединения указанного биспецифичного антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в фармацевтически приемлемом носителе.

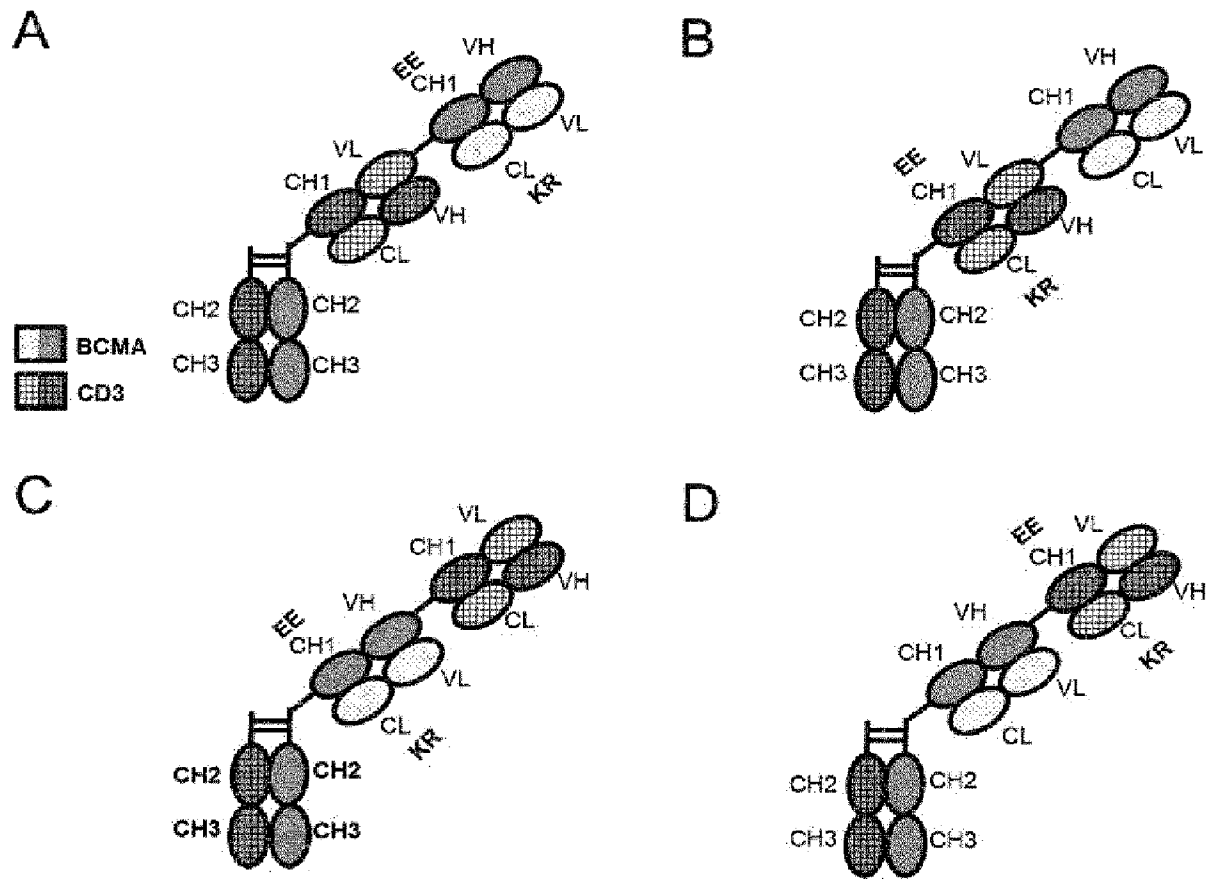
10. Способ изготовления лекарственного средства по п. 9, в котором указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

Фиг. 1

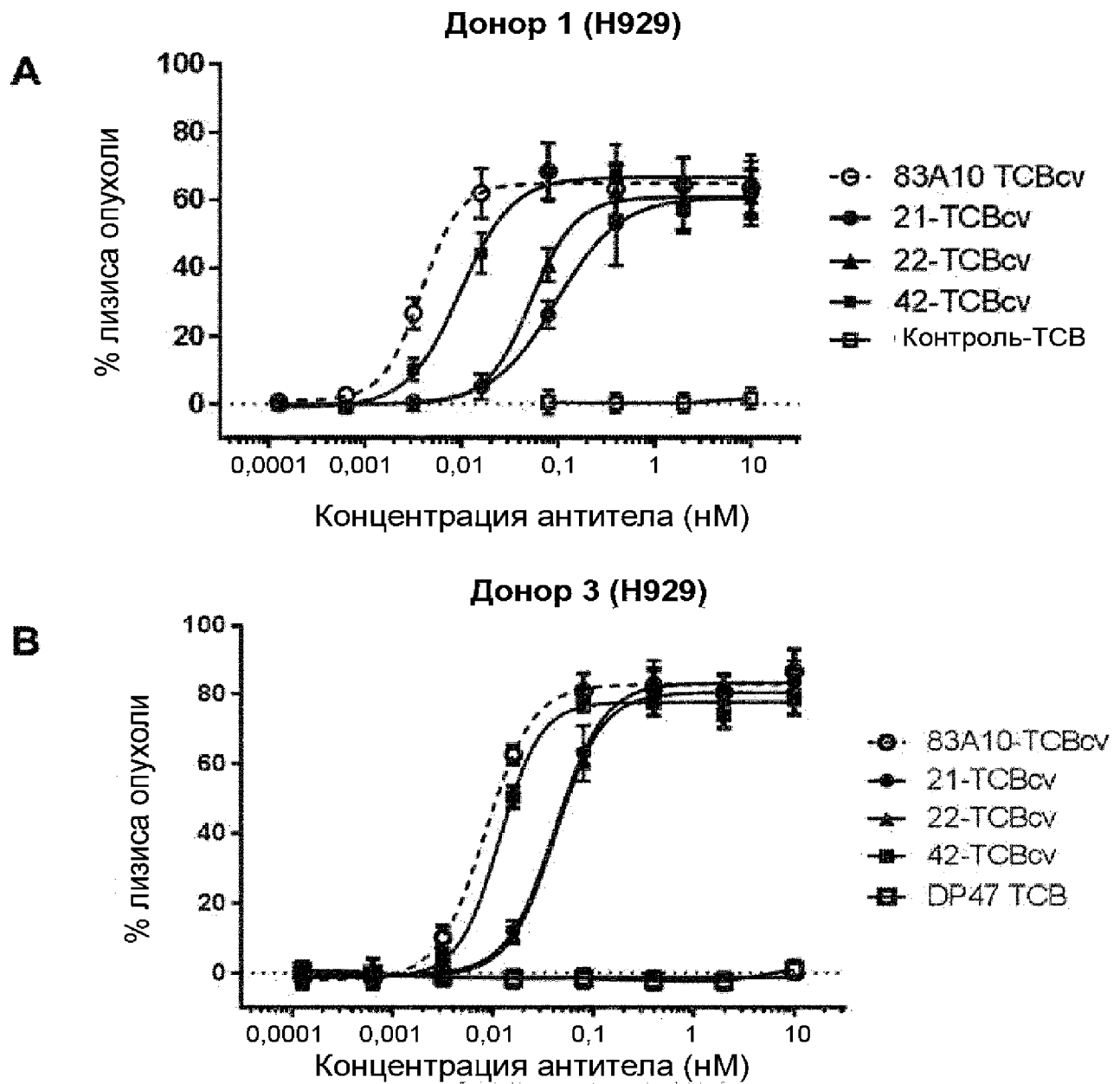


Фиг. 2

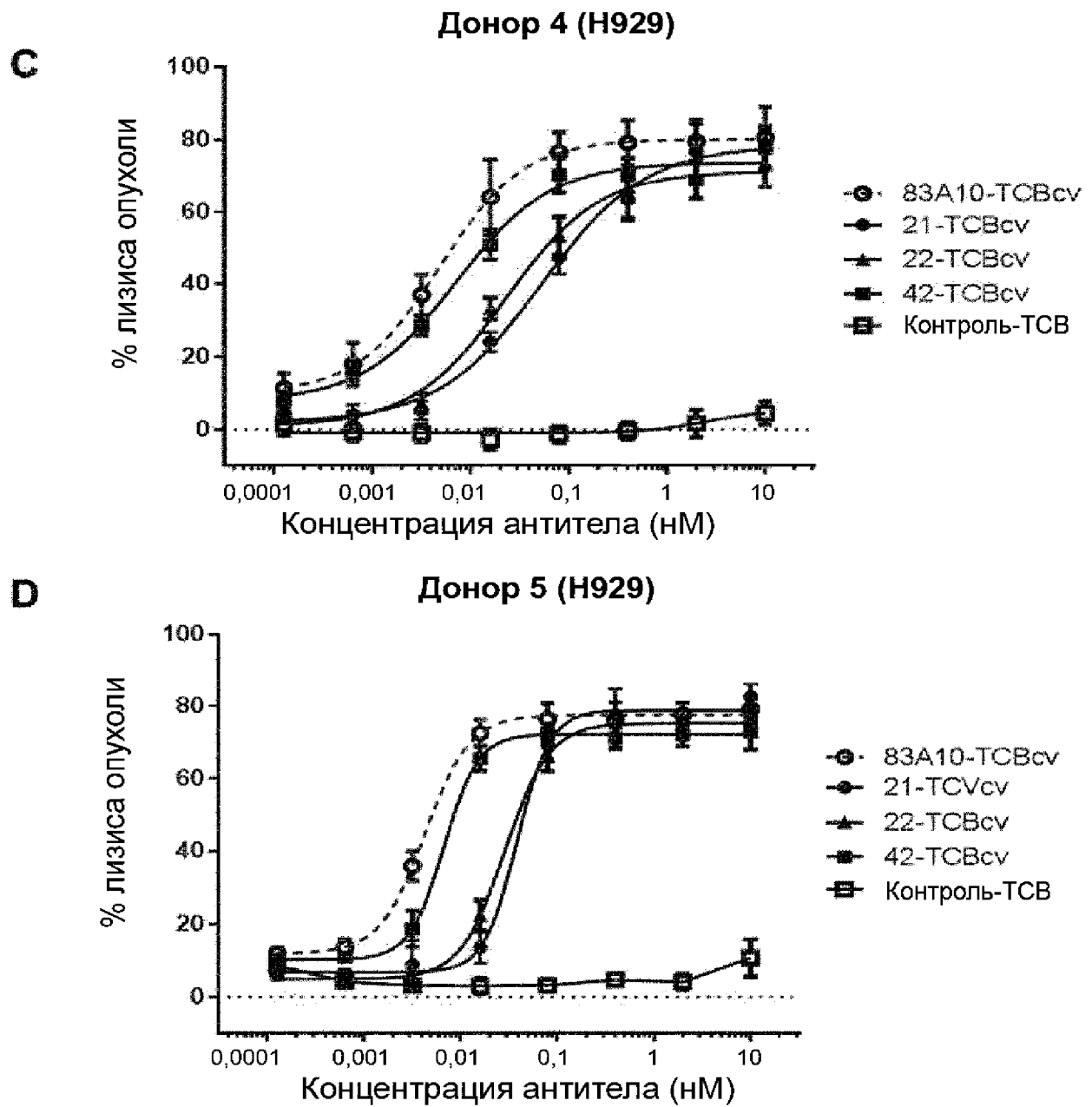




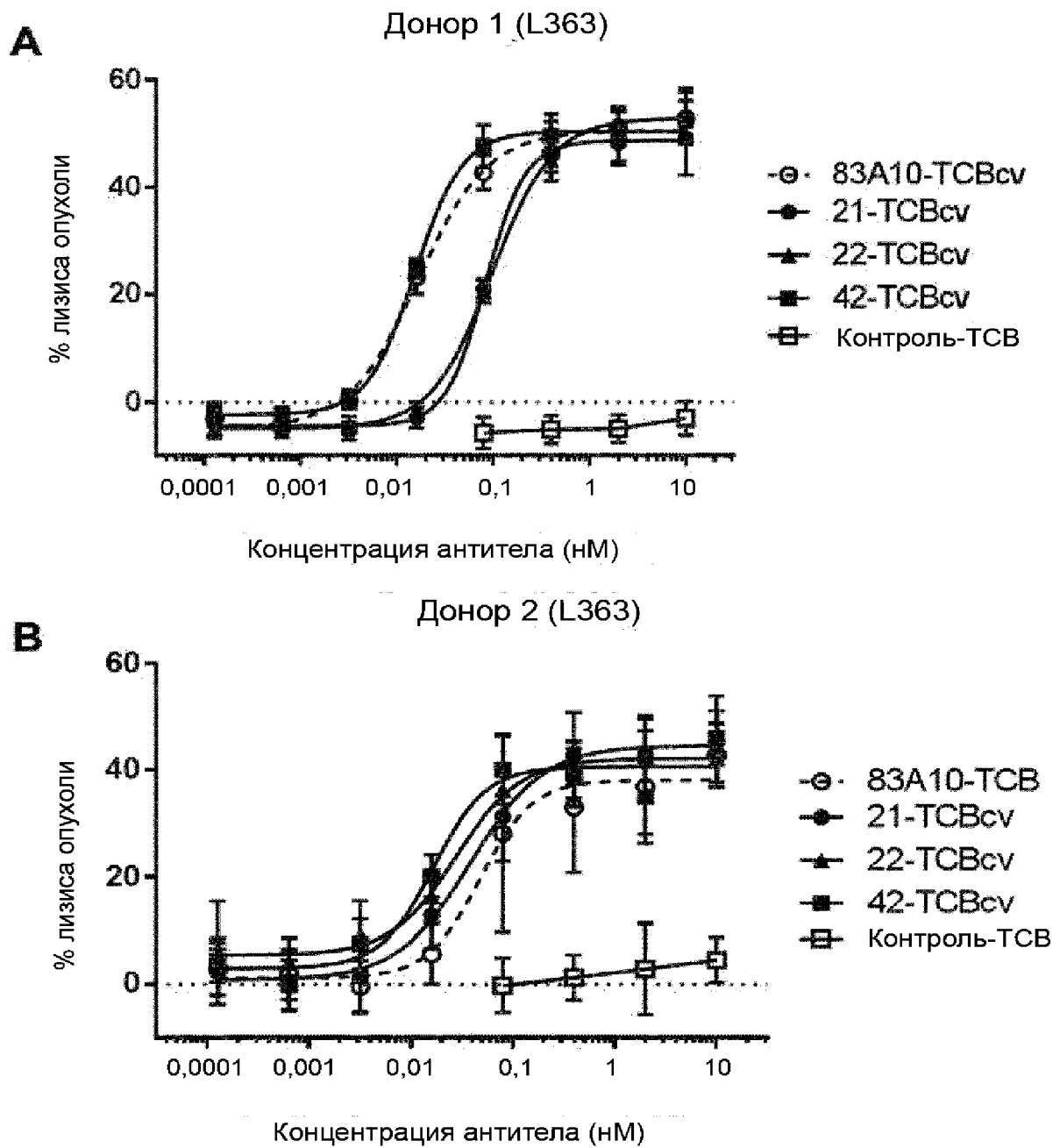
Фиг. 4



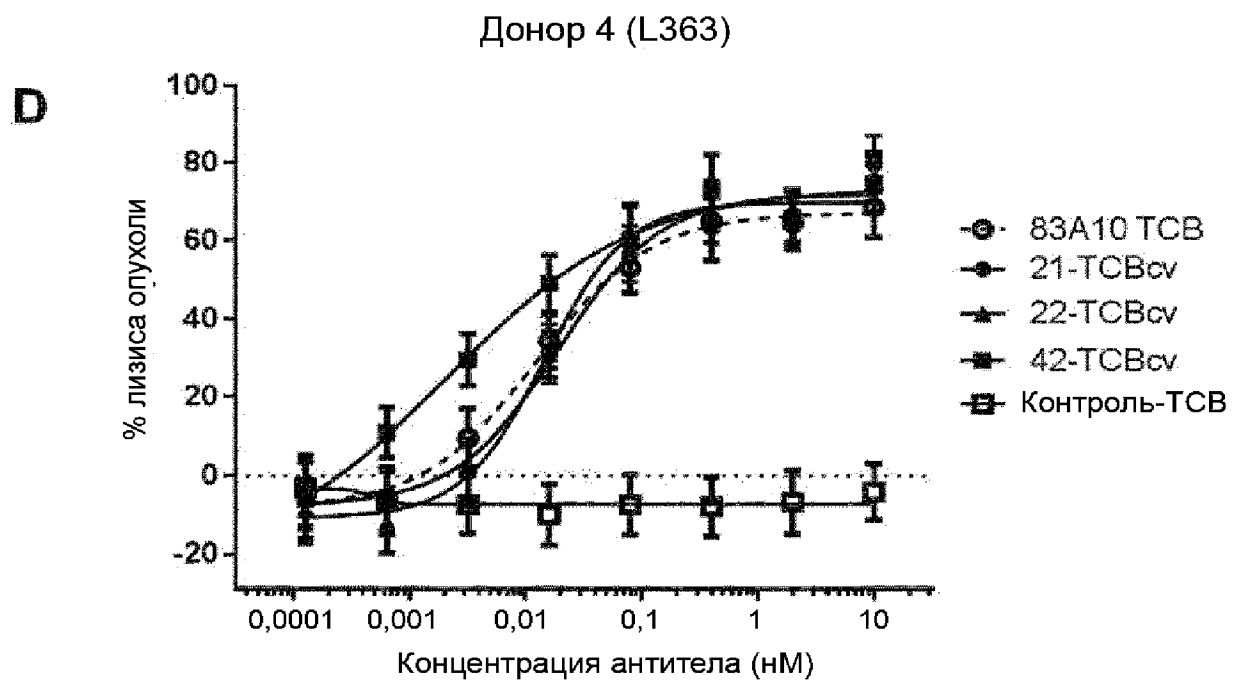
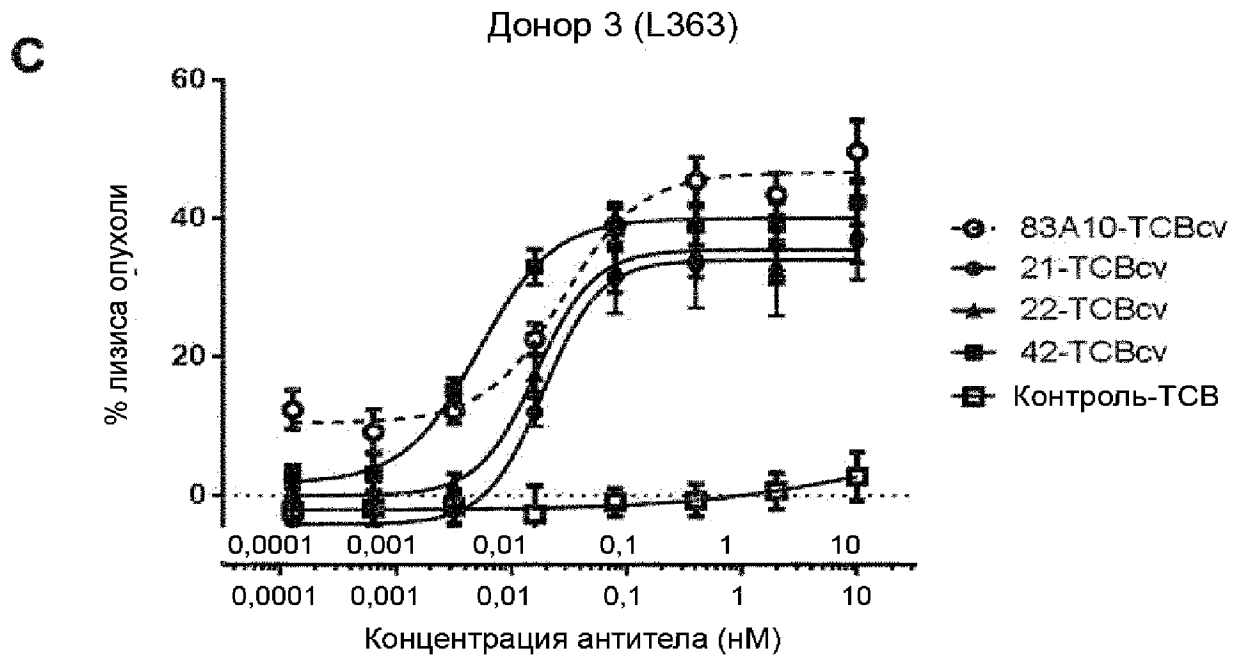
Фиг. 4 (продолжение)



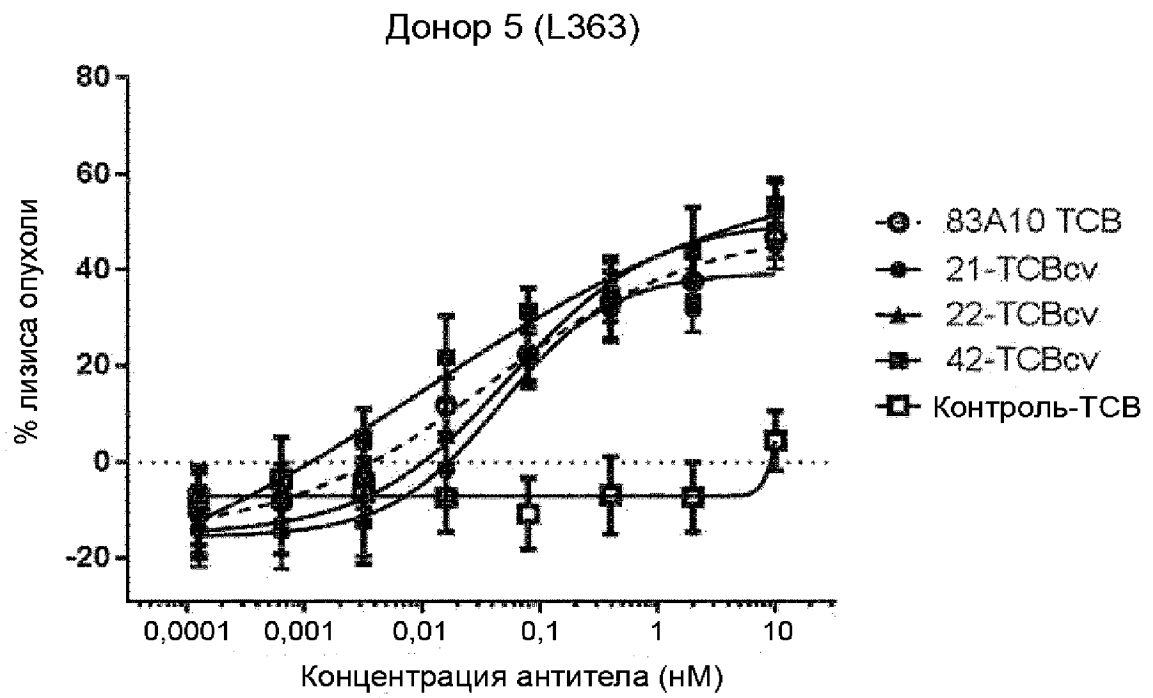
Фиг. 5



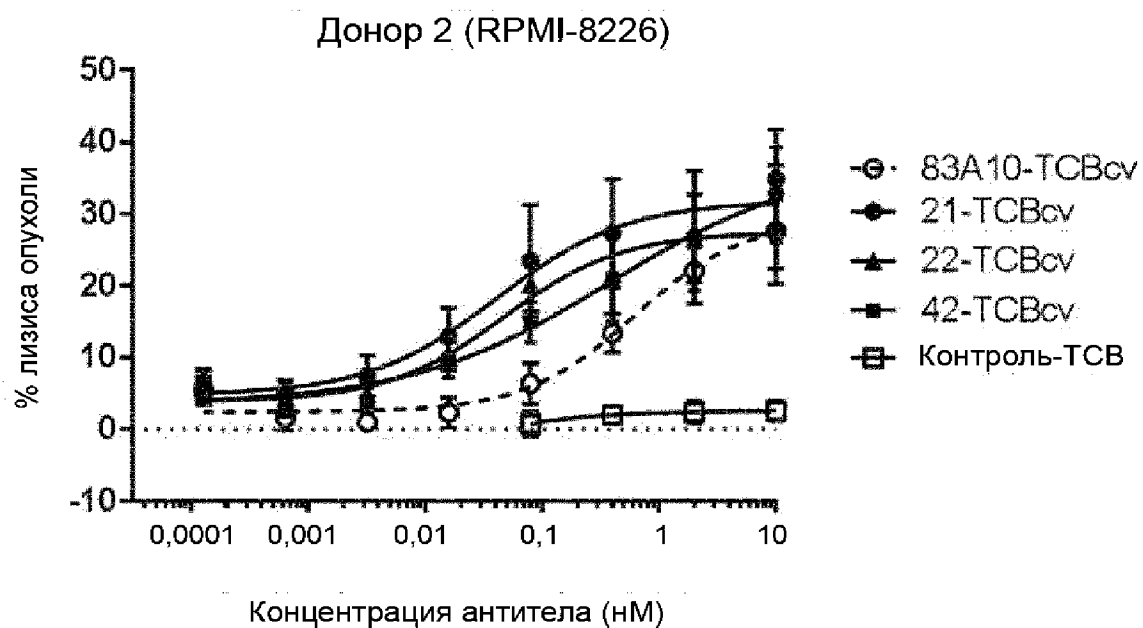
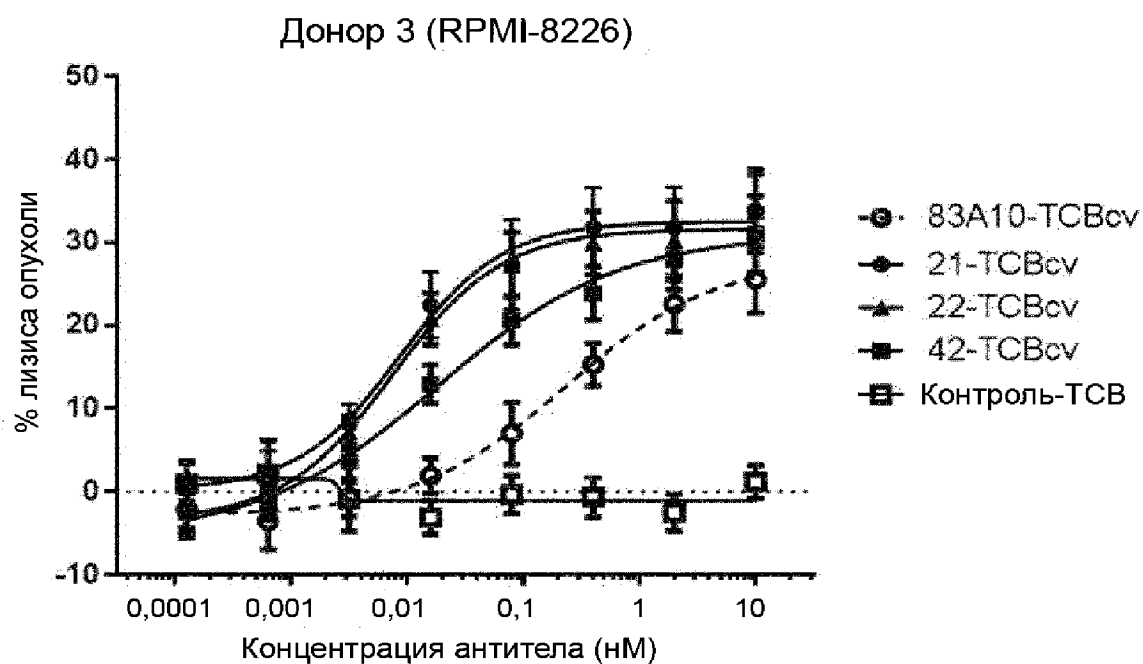
Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 5 (продолжение)

Е

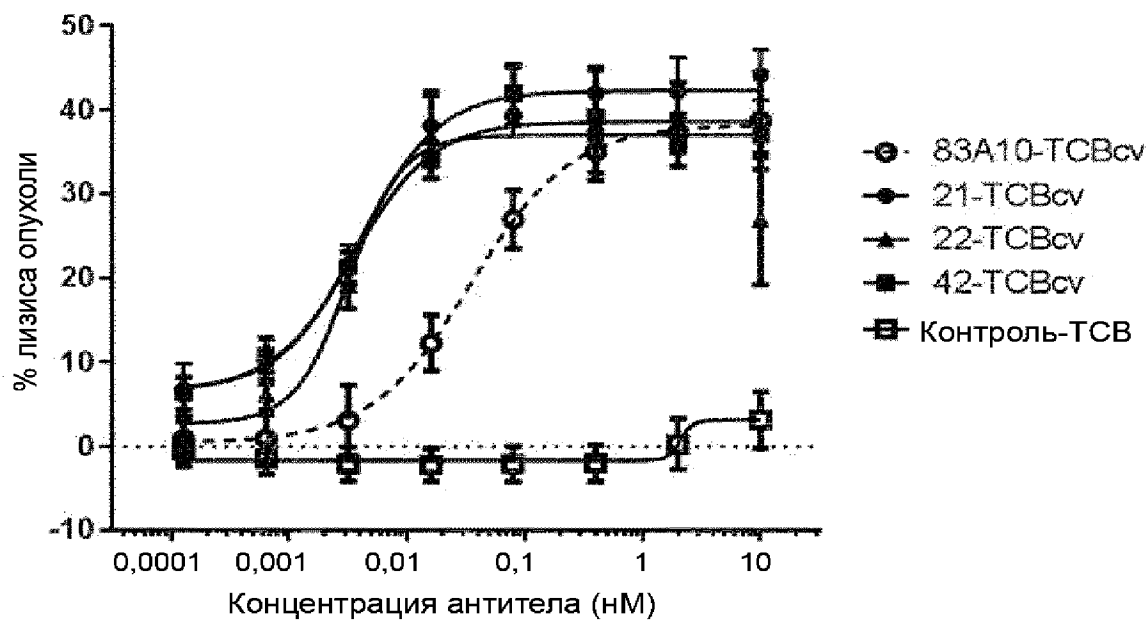
Фиг. 6

A**B**

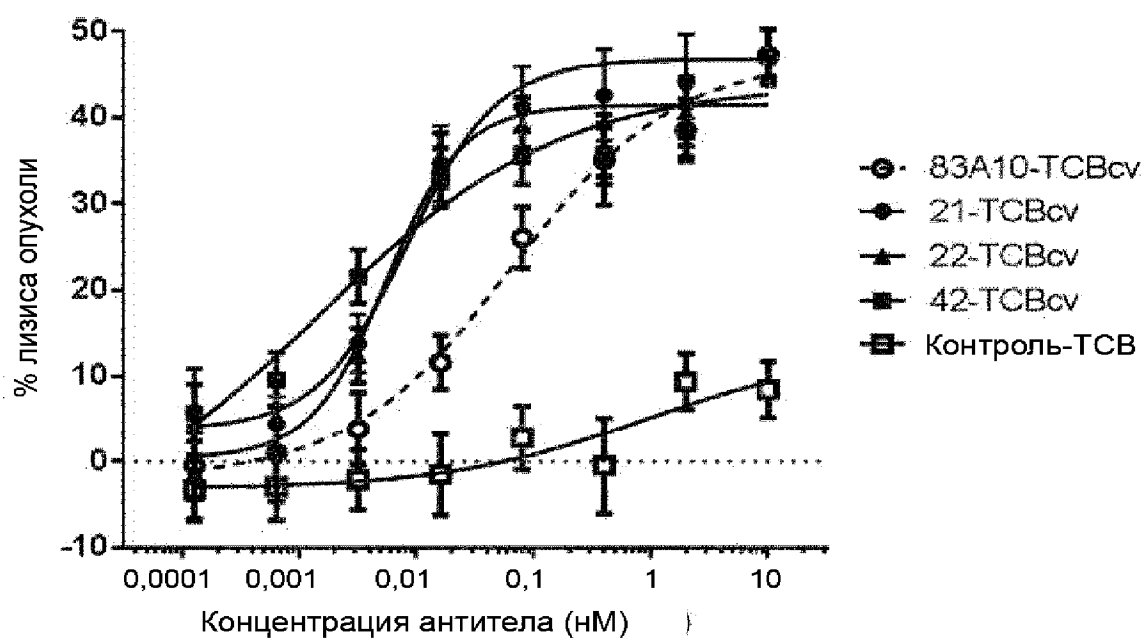
Фиг. 6 (продолжение)

C

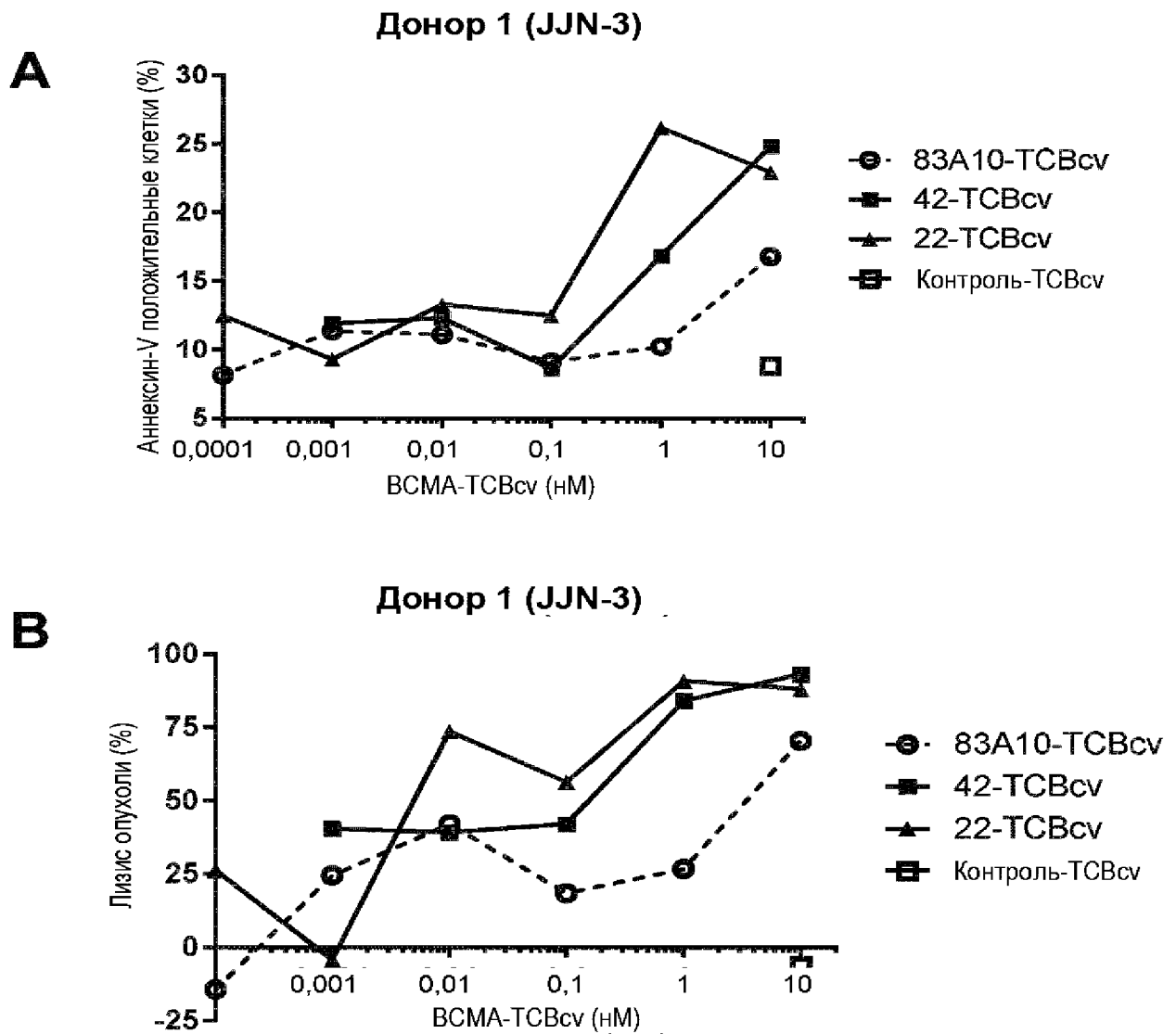
Донор 4 (RPMI-8226)

**D**

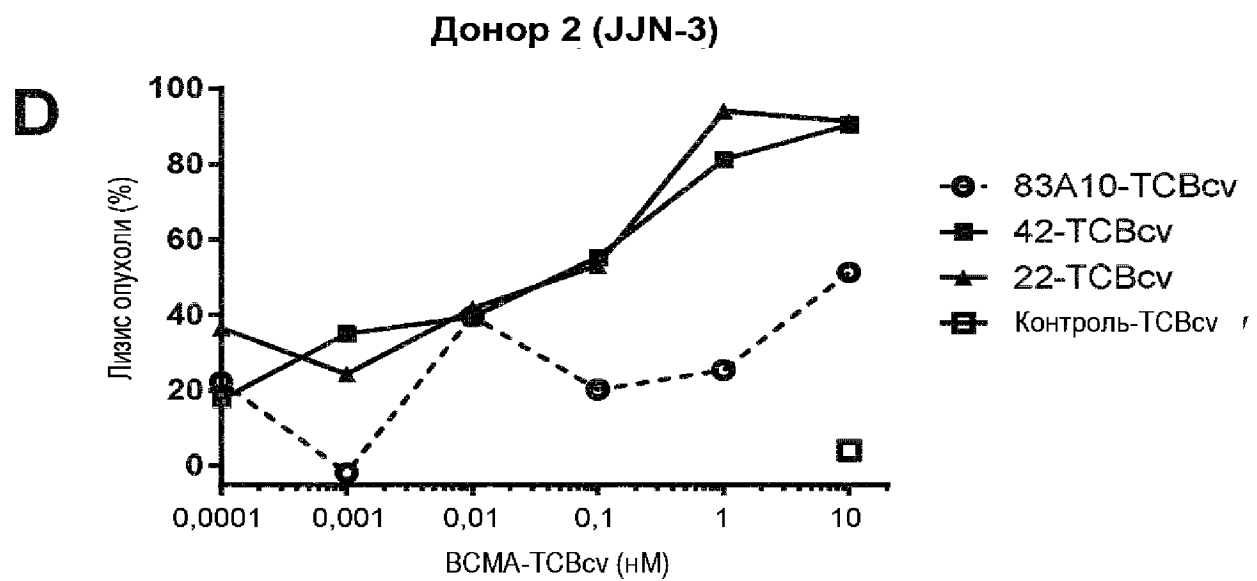
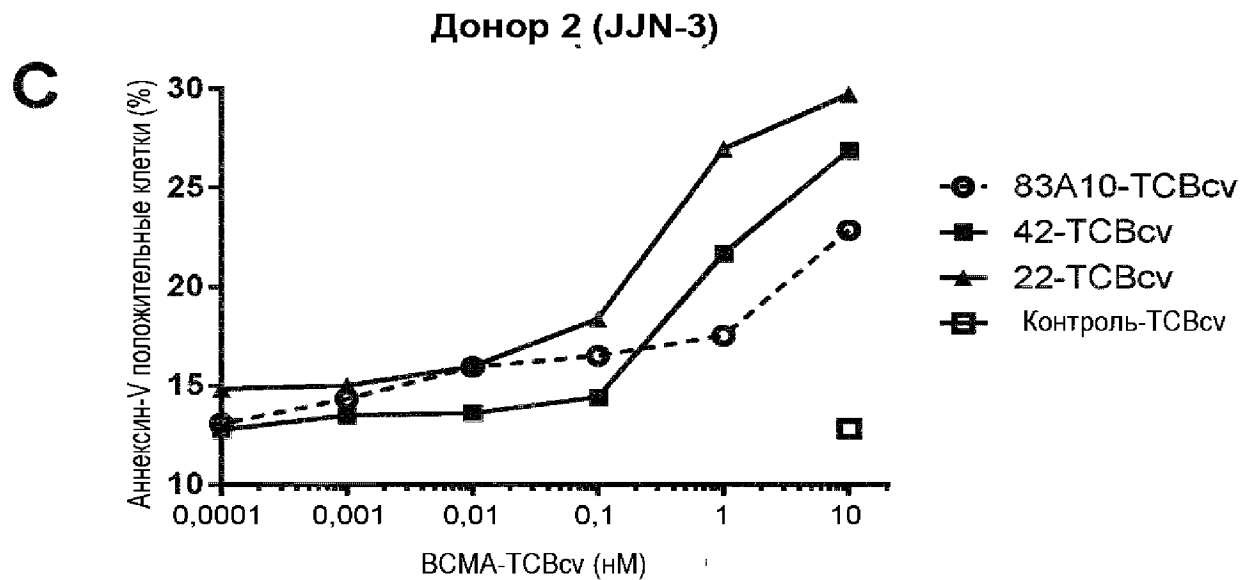
Донор 5 (RPMI-8226)



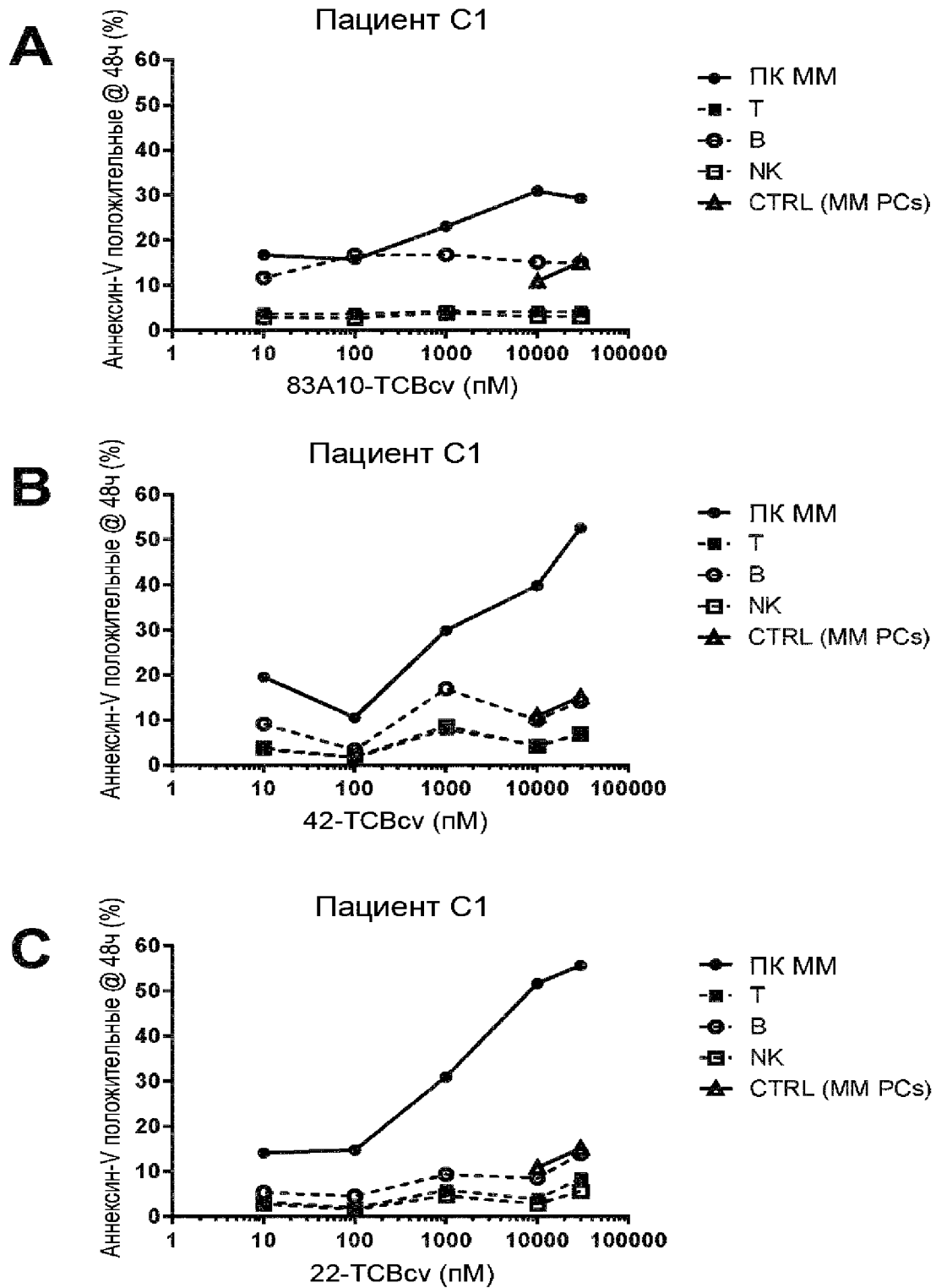
Фиг. 7



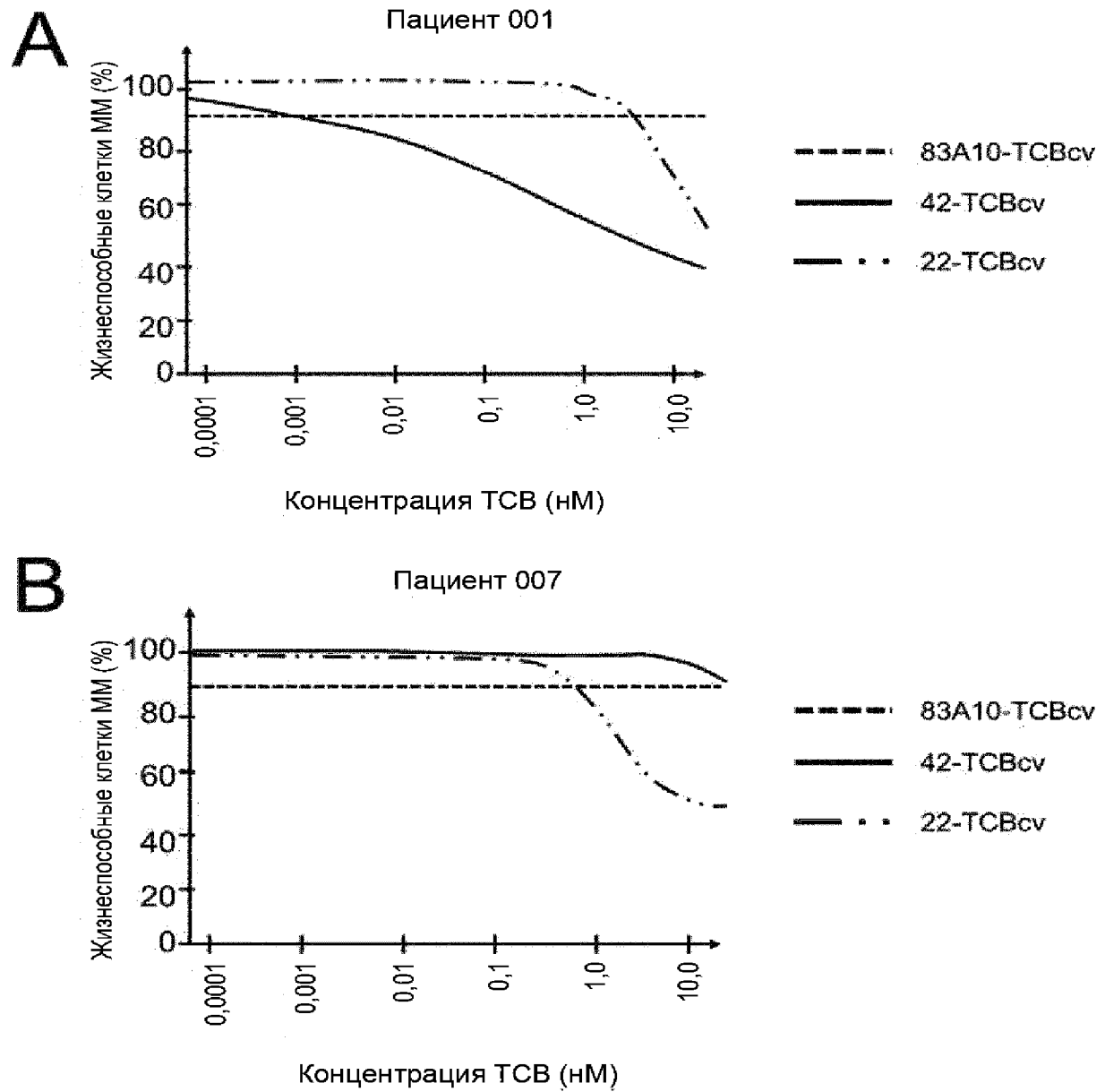
Фиг. 7 (продолжение)



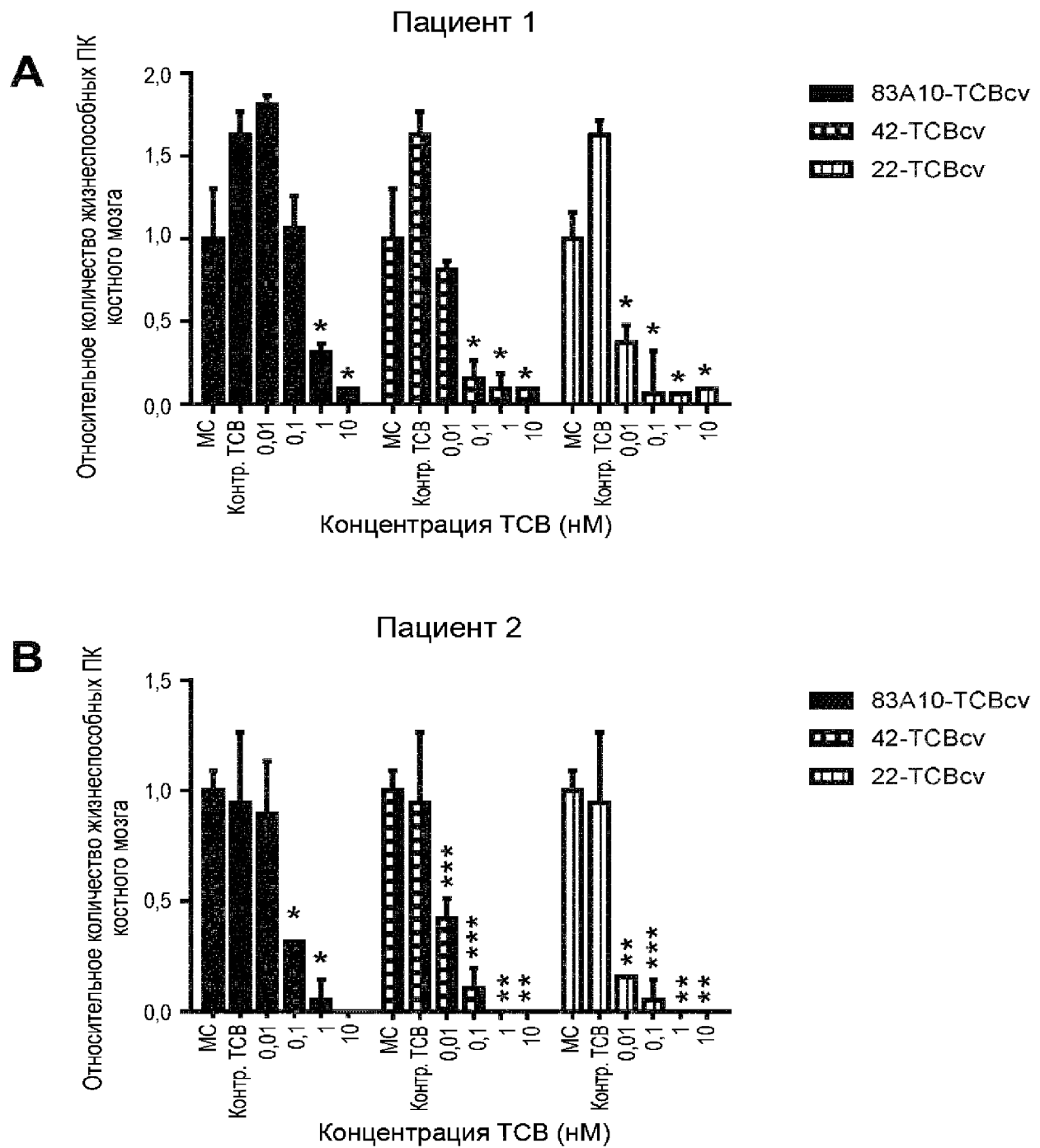
Фиг. 8



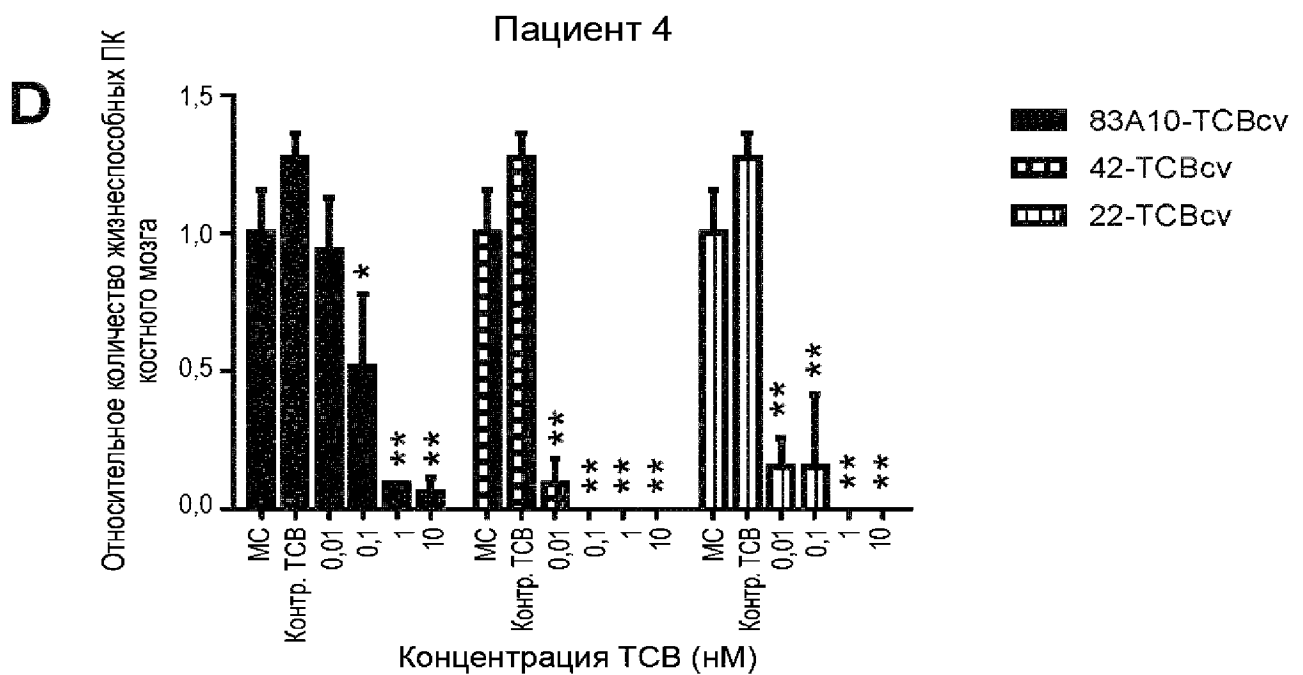
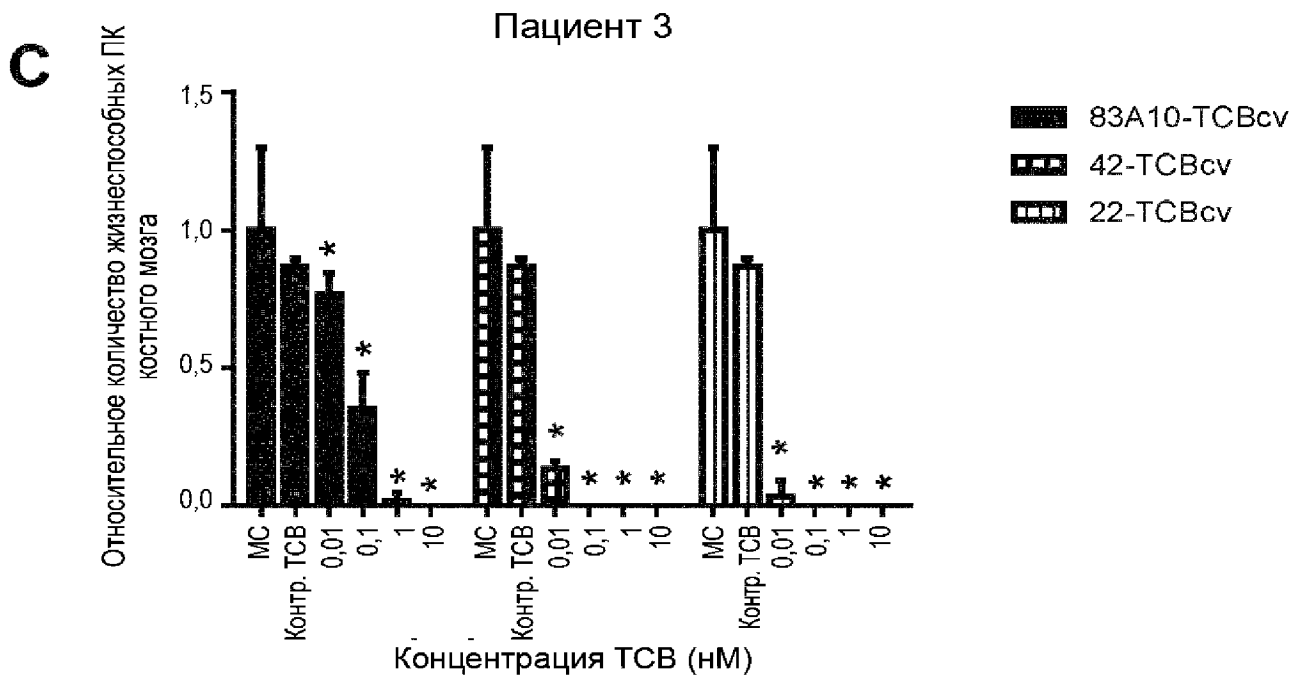
Фиг. 9



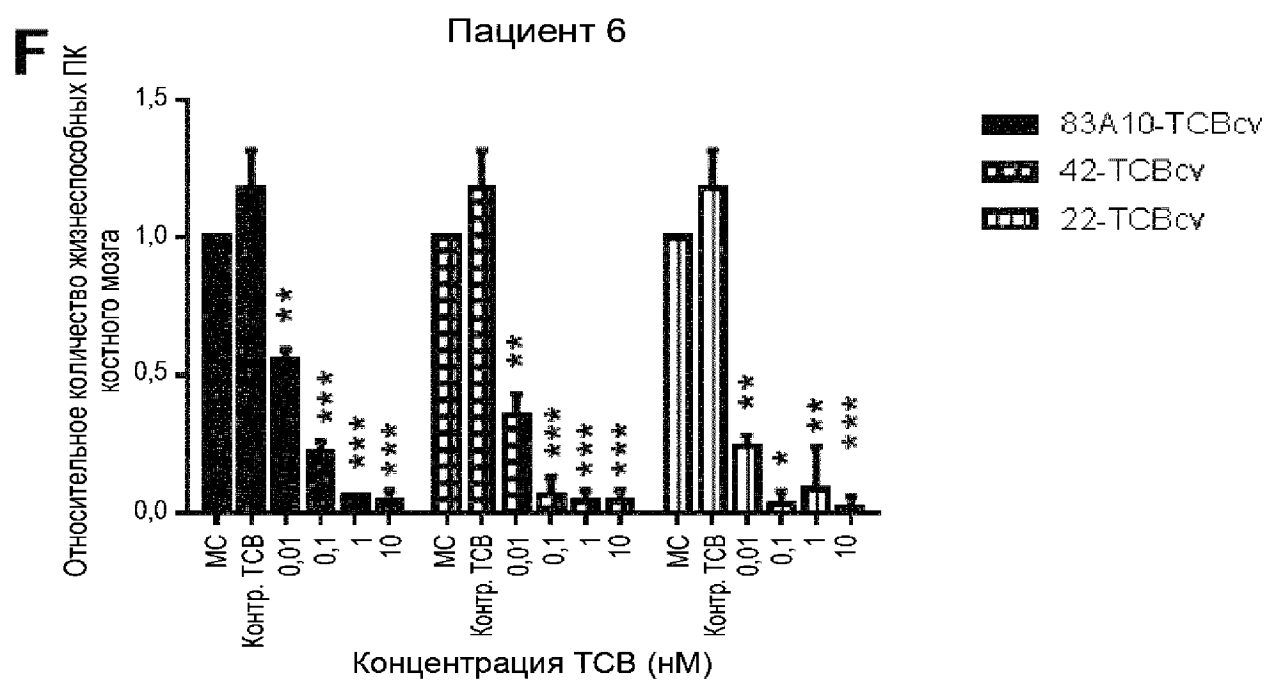
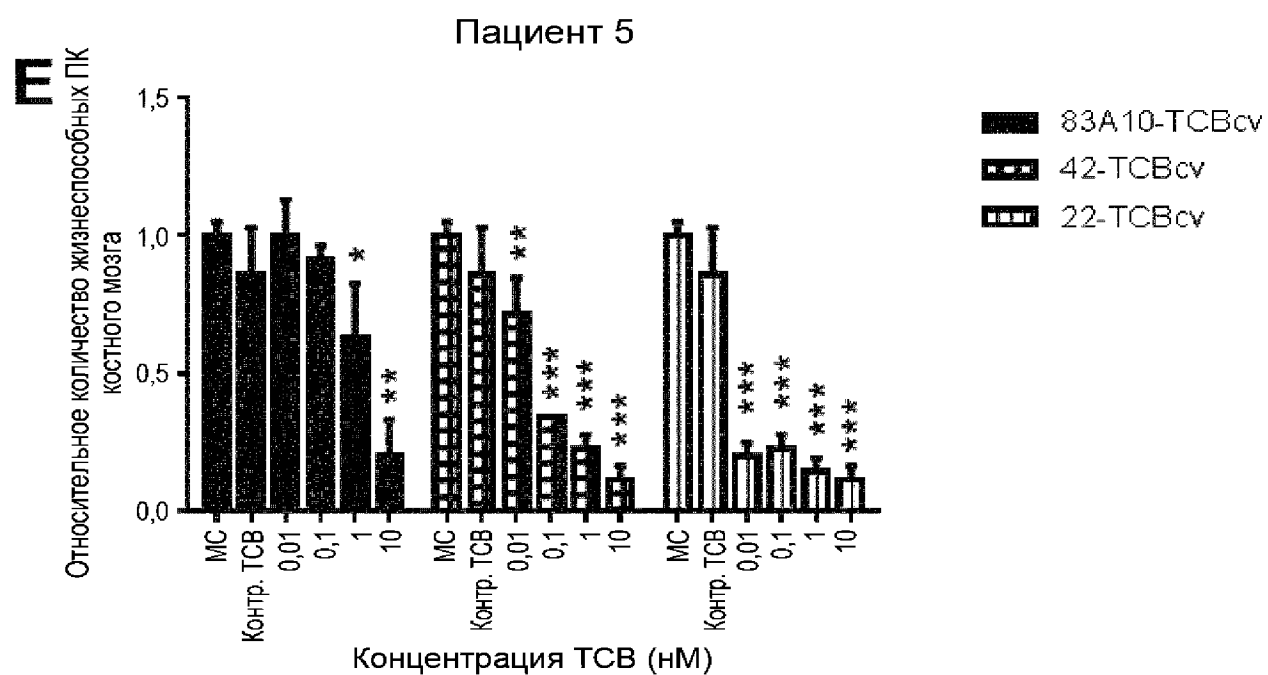
Фиг. 10



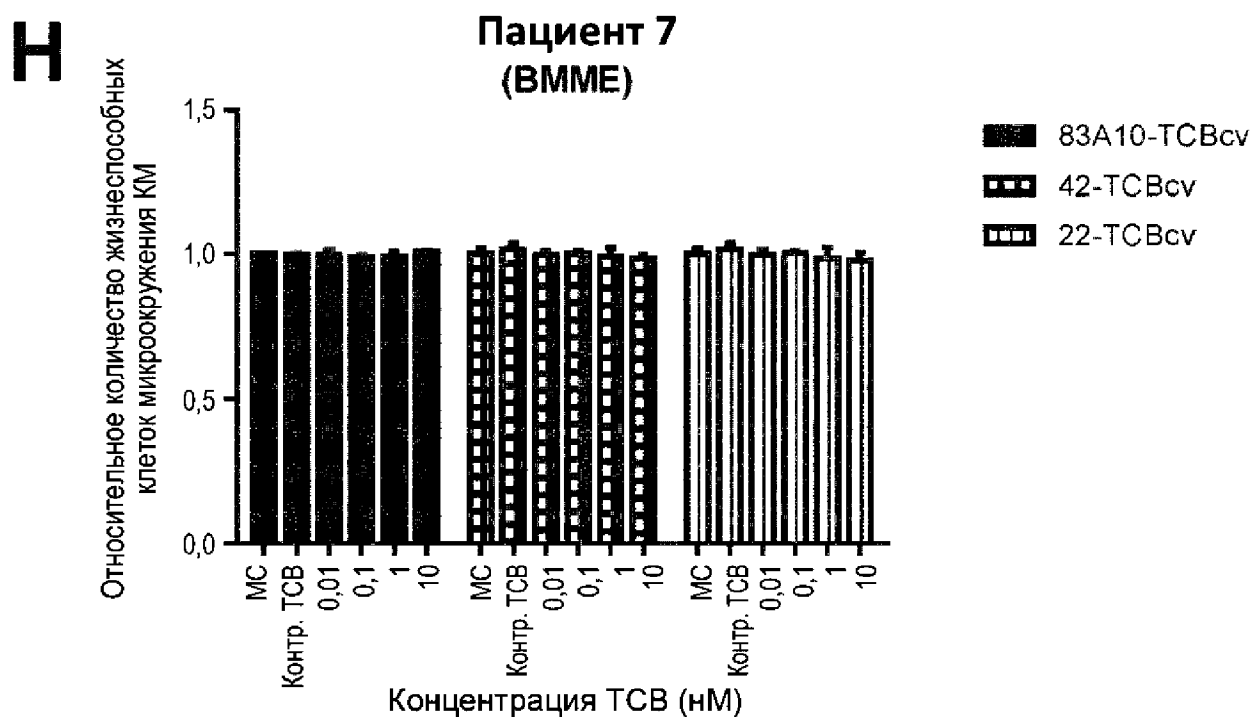
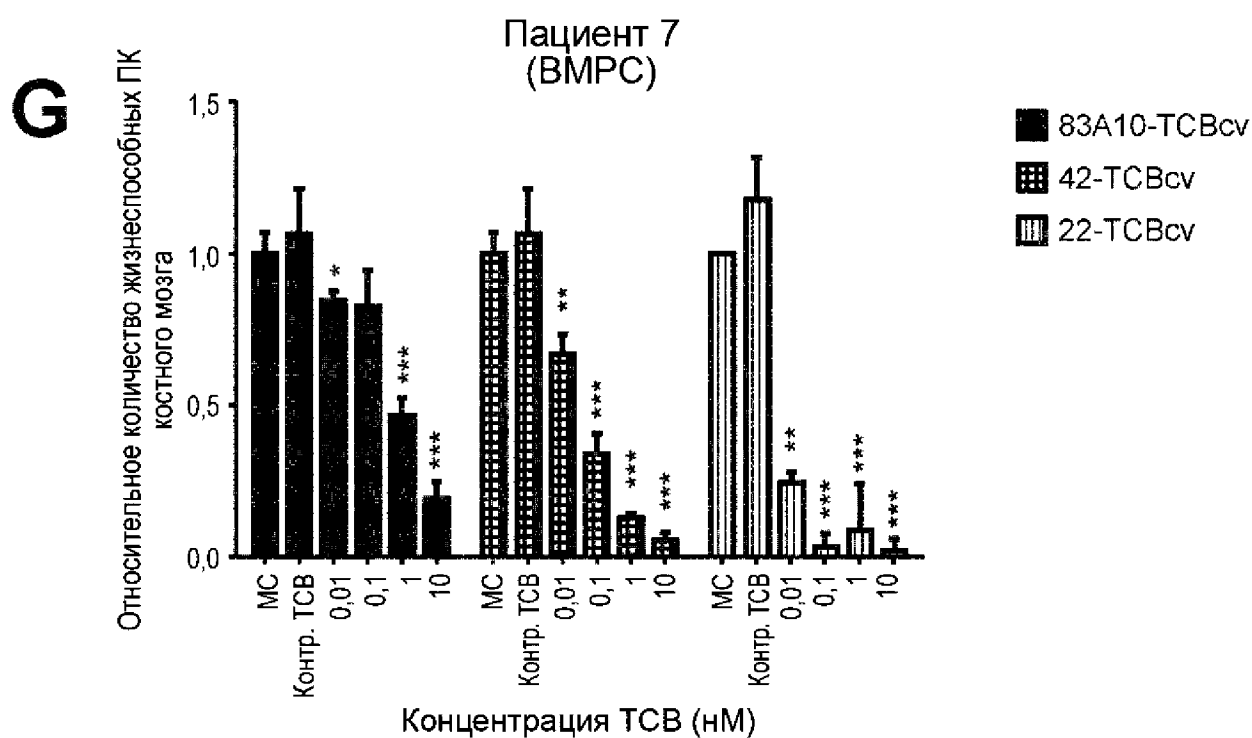
Фиг. 10 (продолжение)



Фиг. 10 (продолжение)

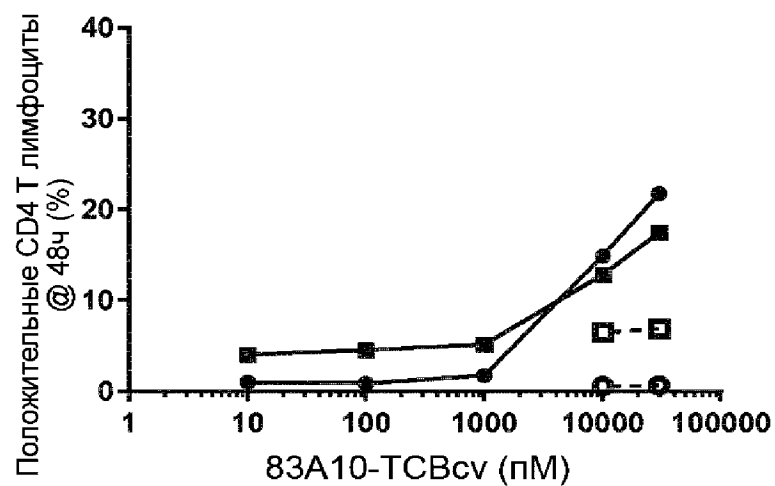


Фиг. 10 (продолжение)

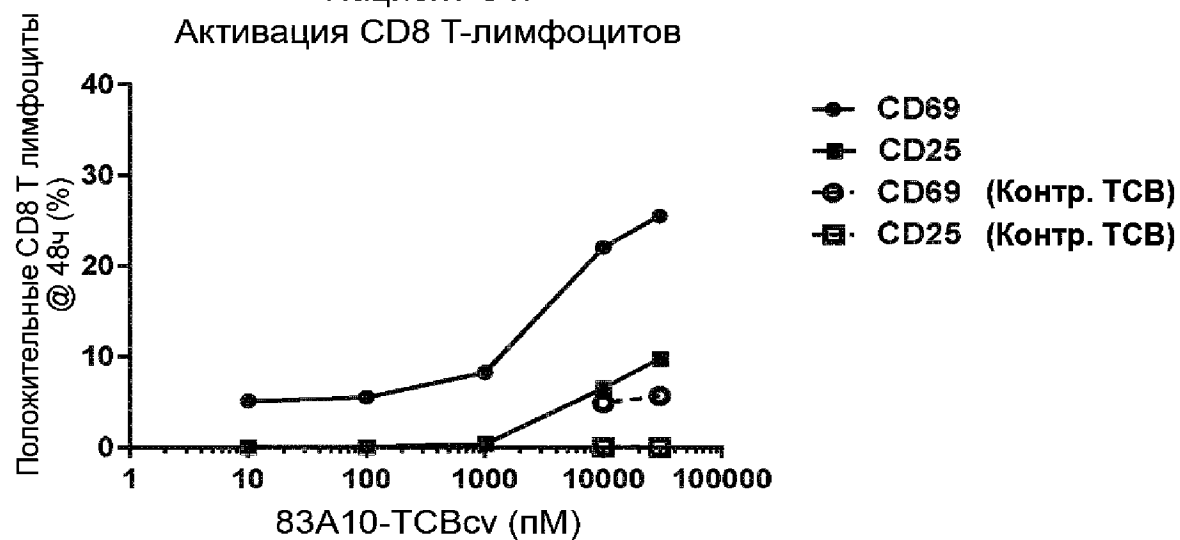


Фиг. 11А

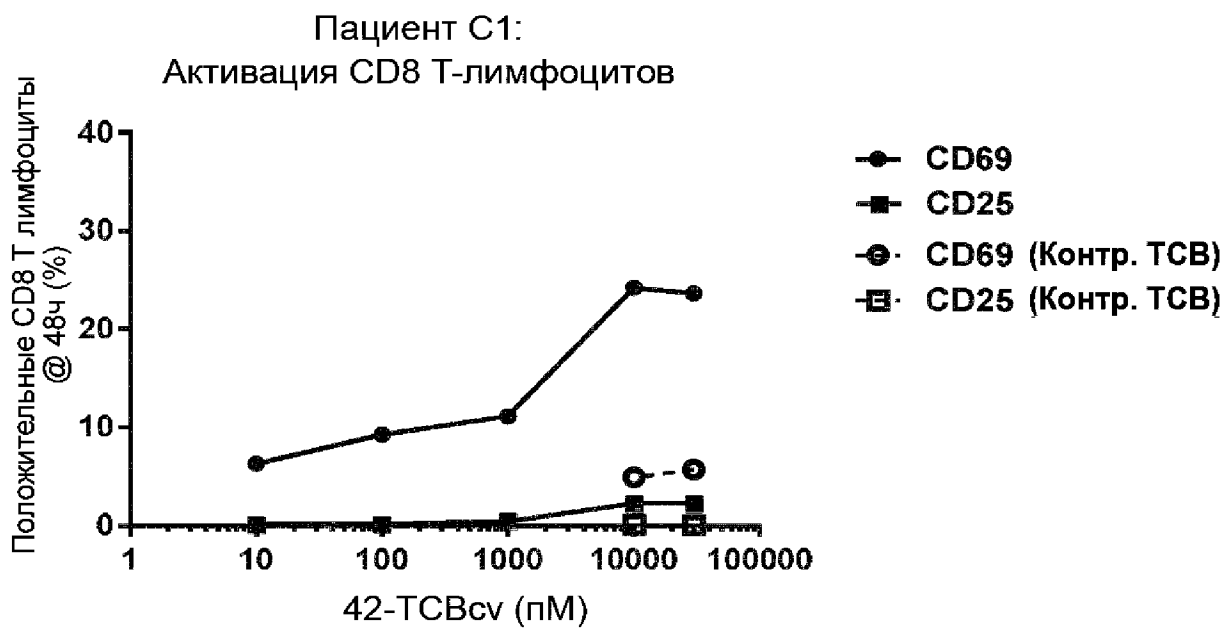
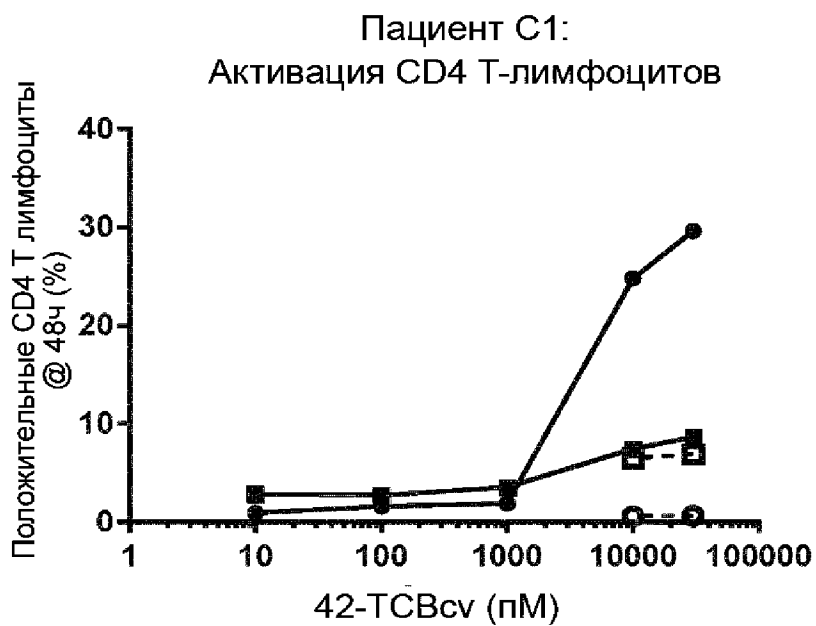
Пациент С1:
Активация CD4 Т-лимфоцитов



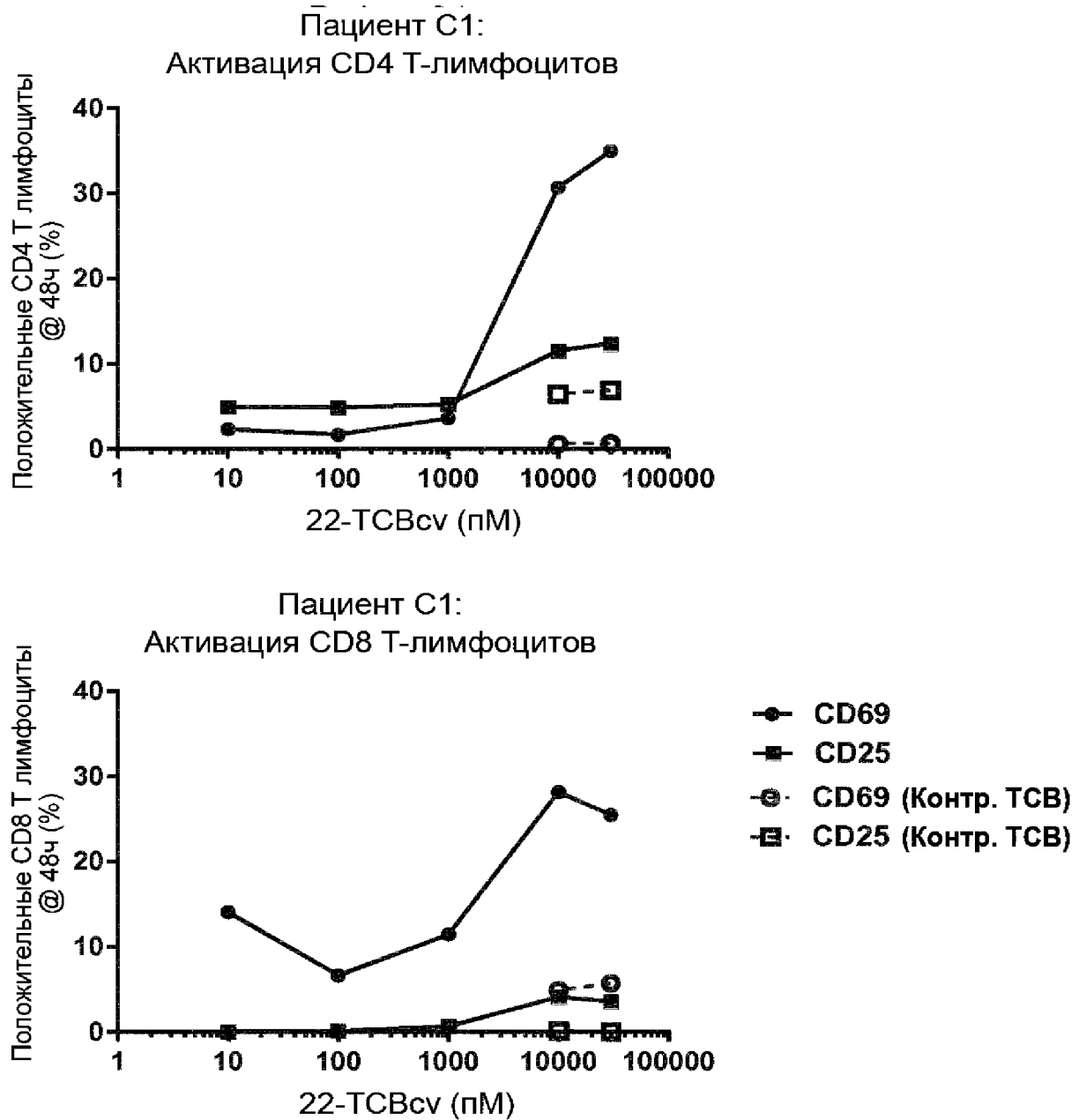
Пациент С1:
Активация CD8 Т-лимфоцитов



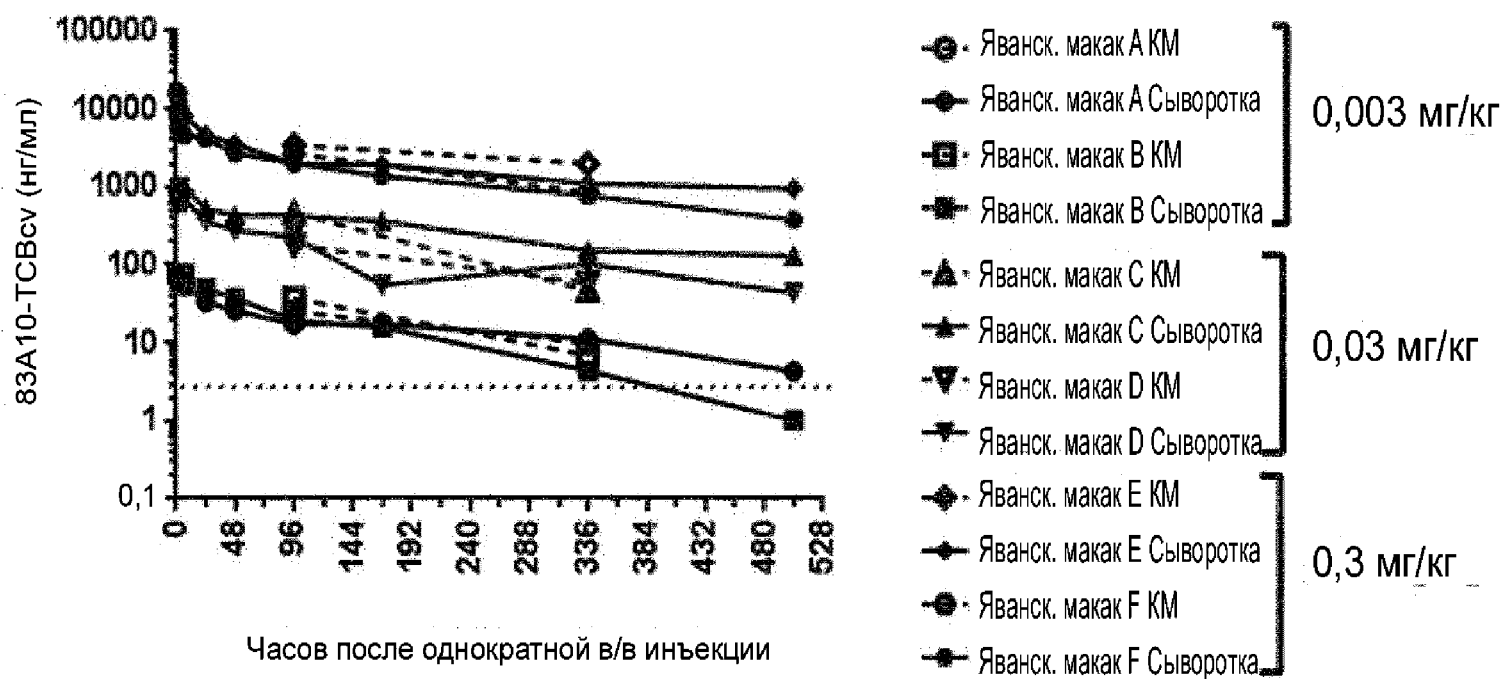
Фиг. 11В



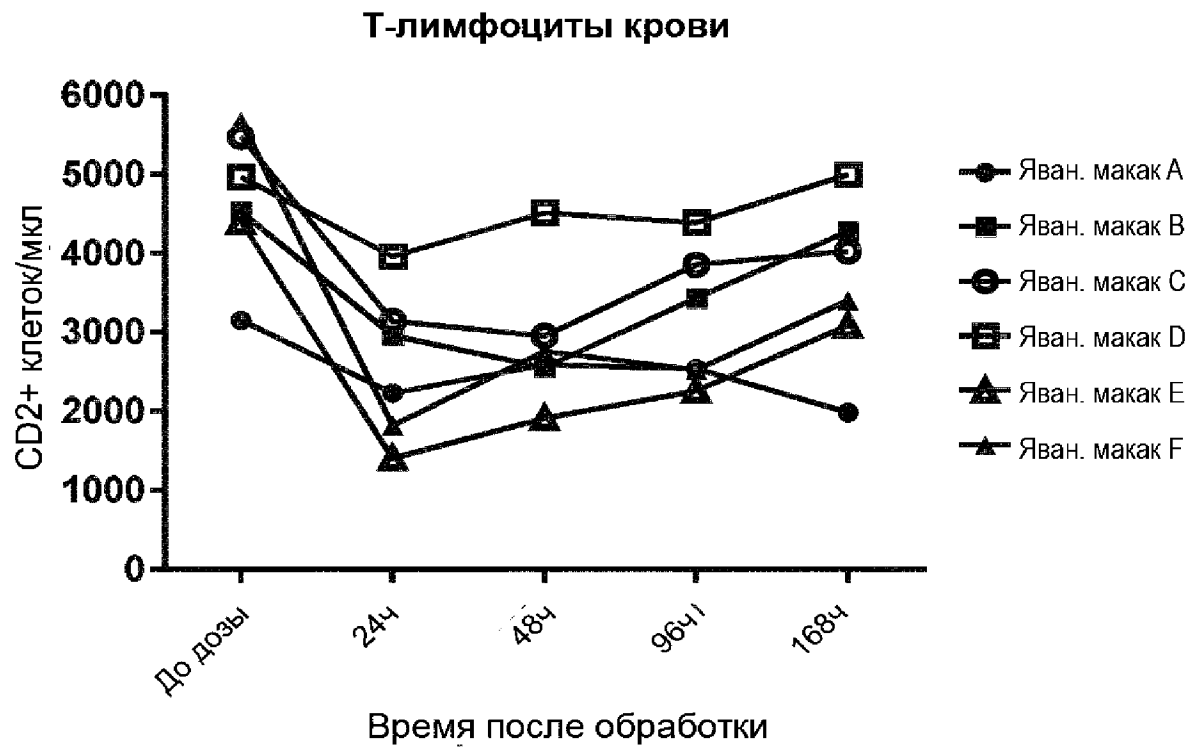
Фиг. 11С

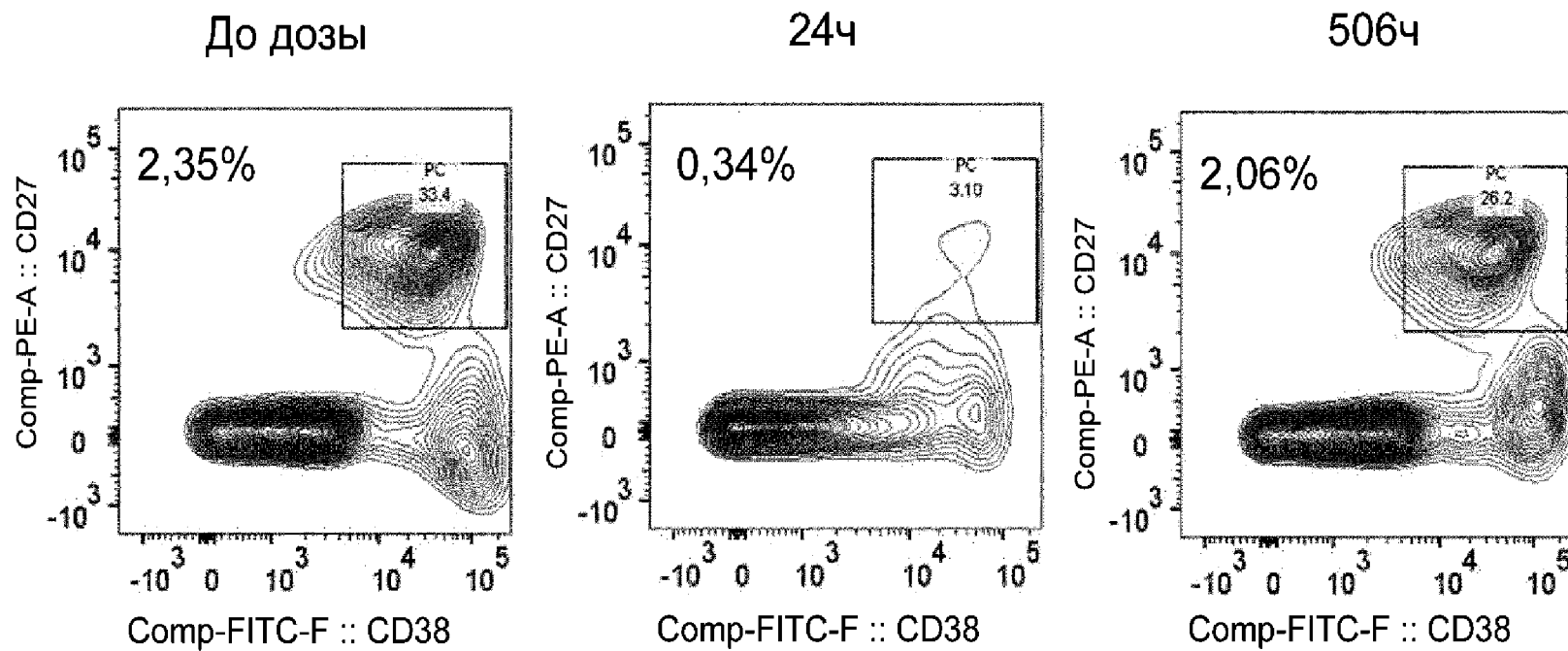


Концентрации 83A10-TCBcy у яванского макака
после однократной в/в инъекции

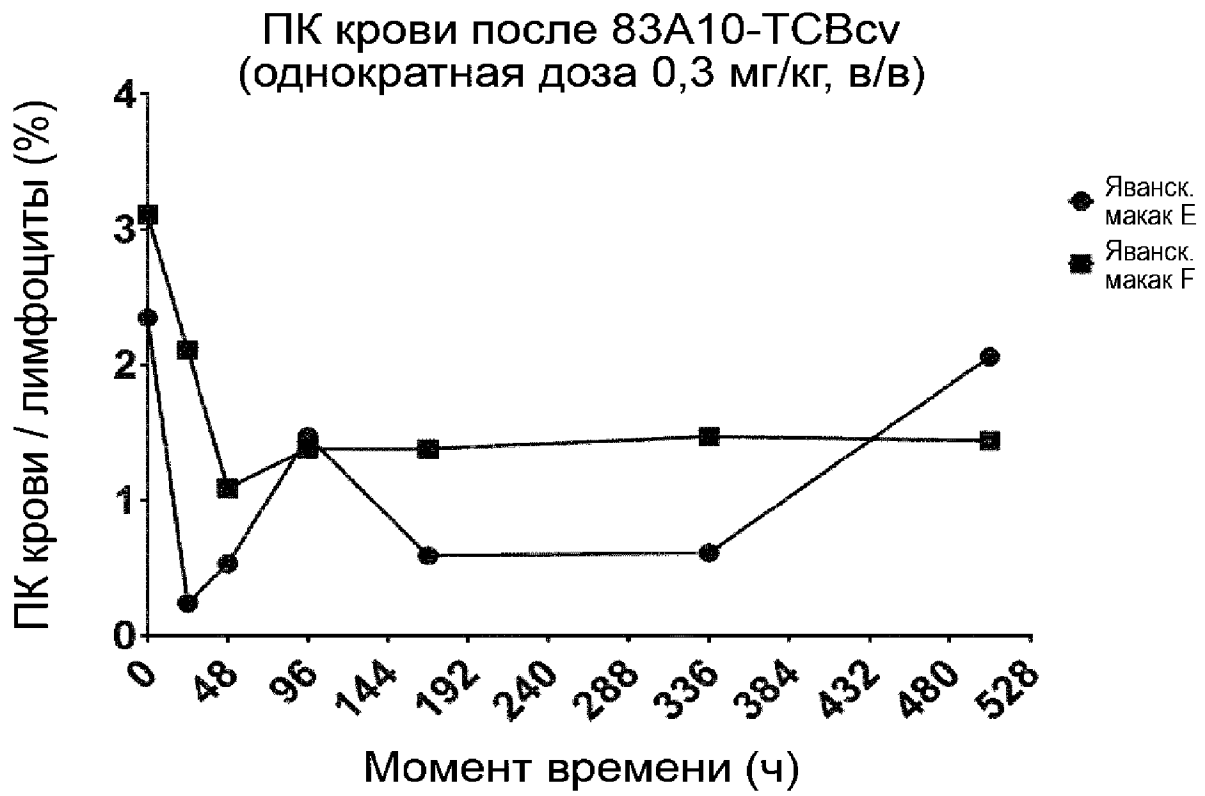


Фиг. 13

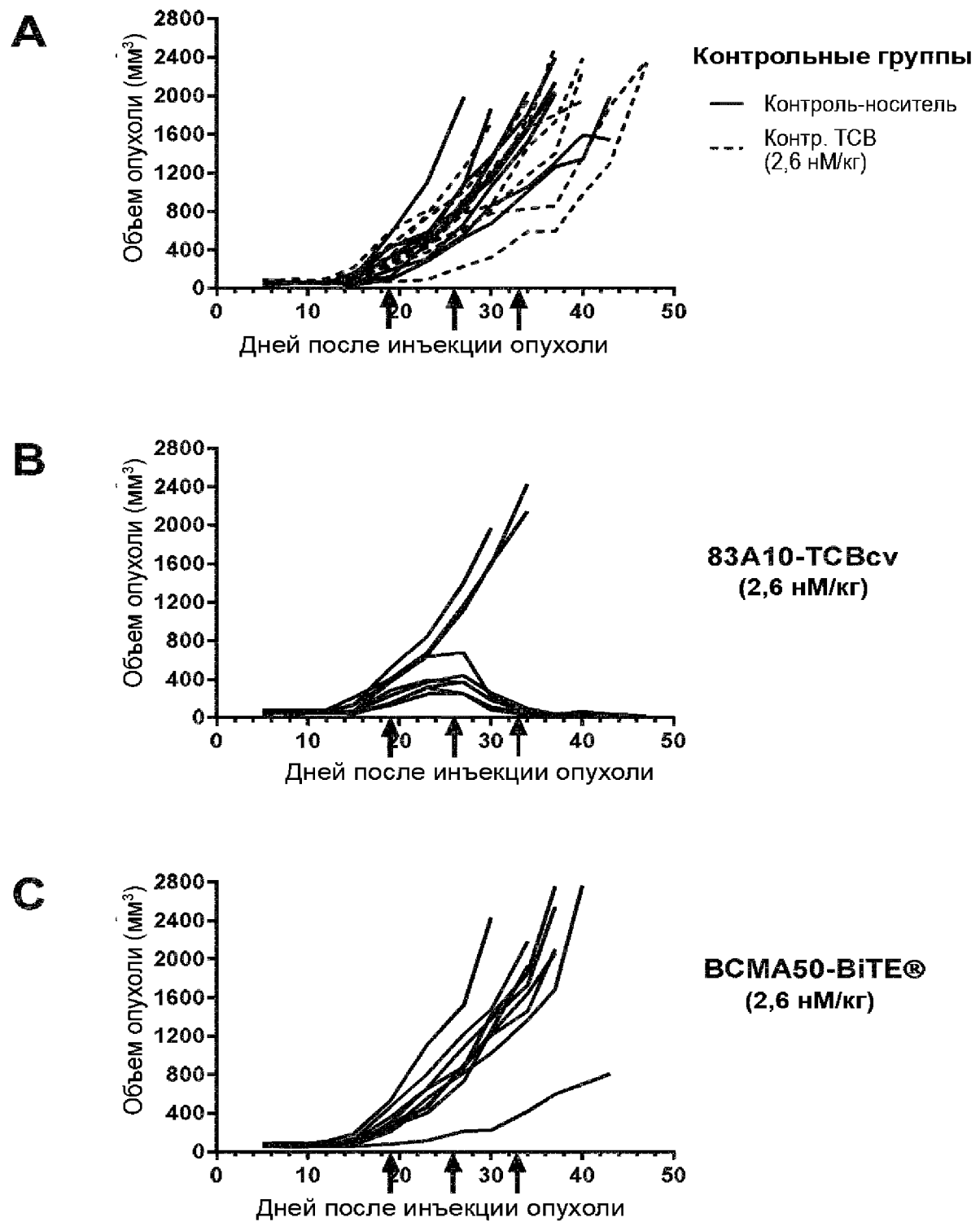




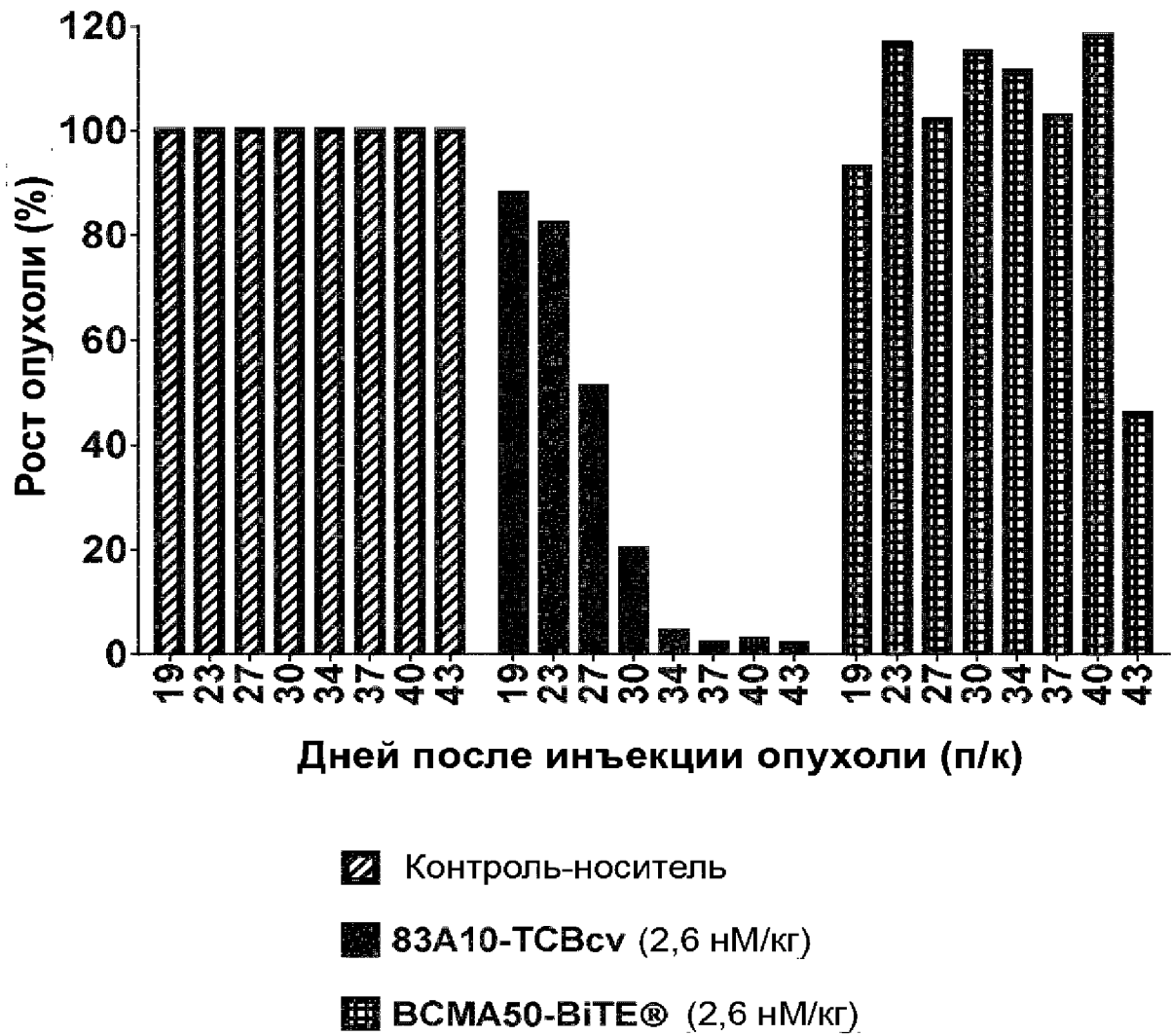
Фиг. 14В



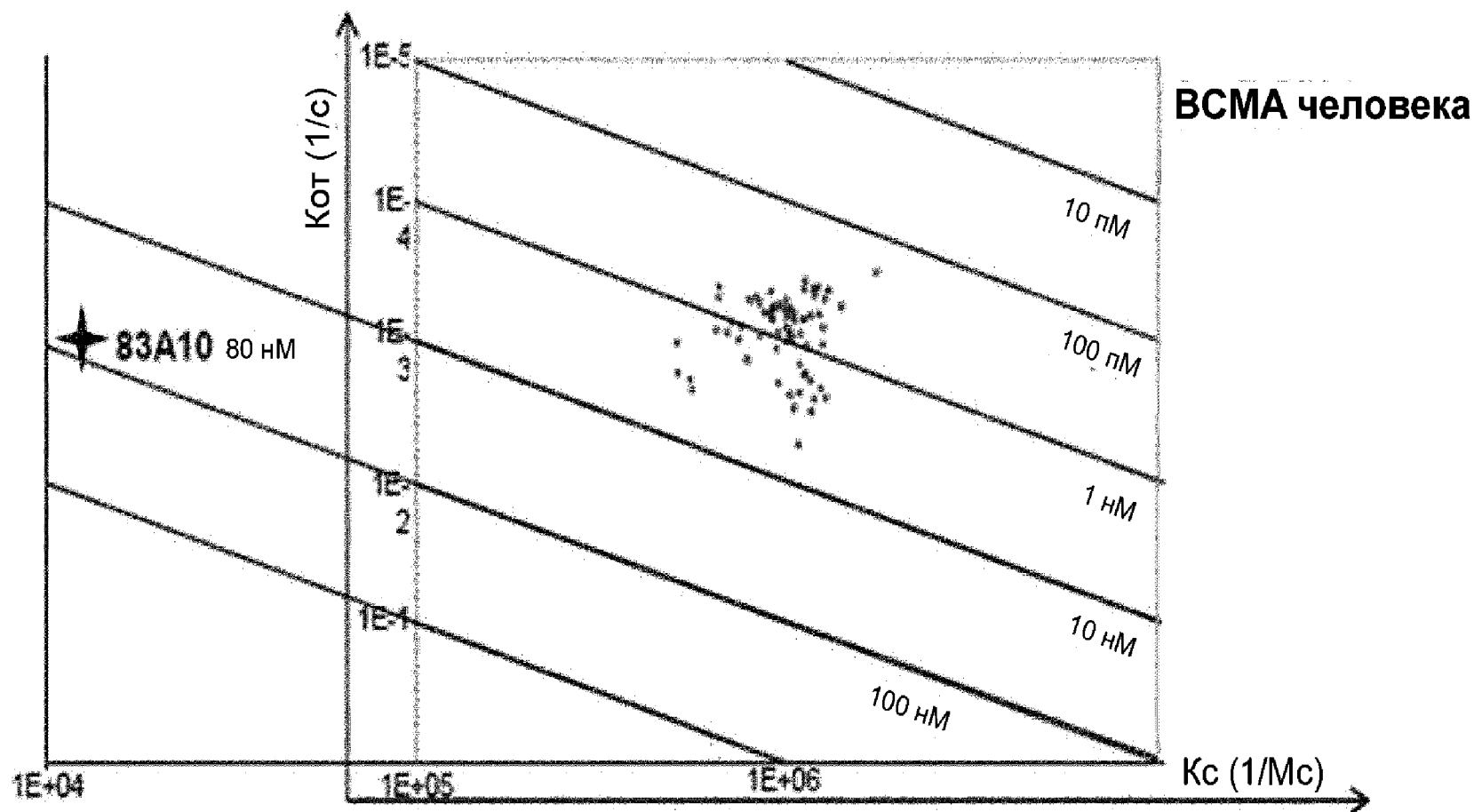
Фиг. 15



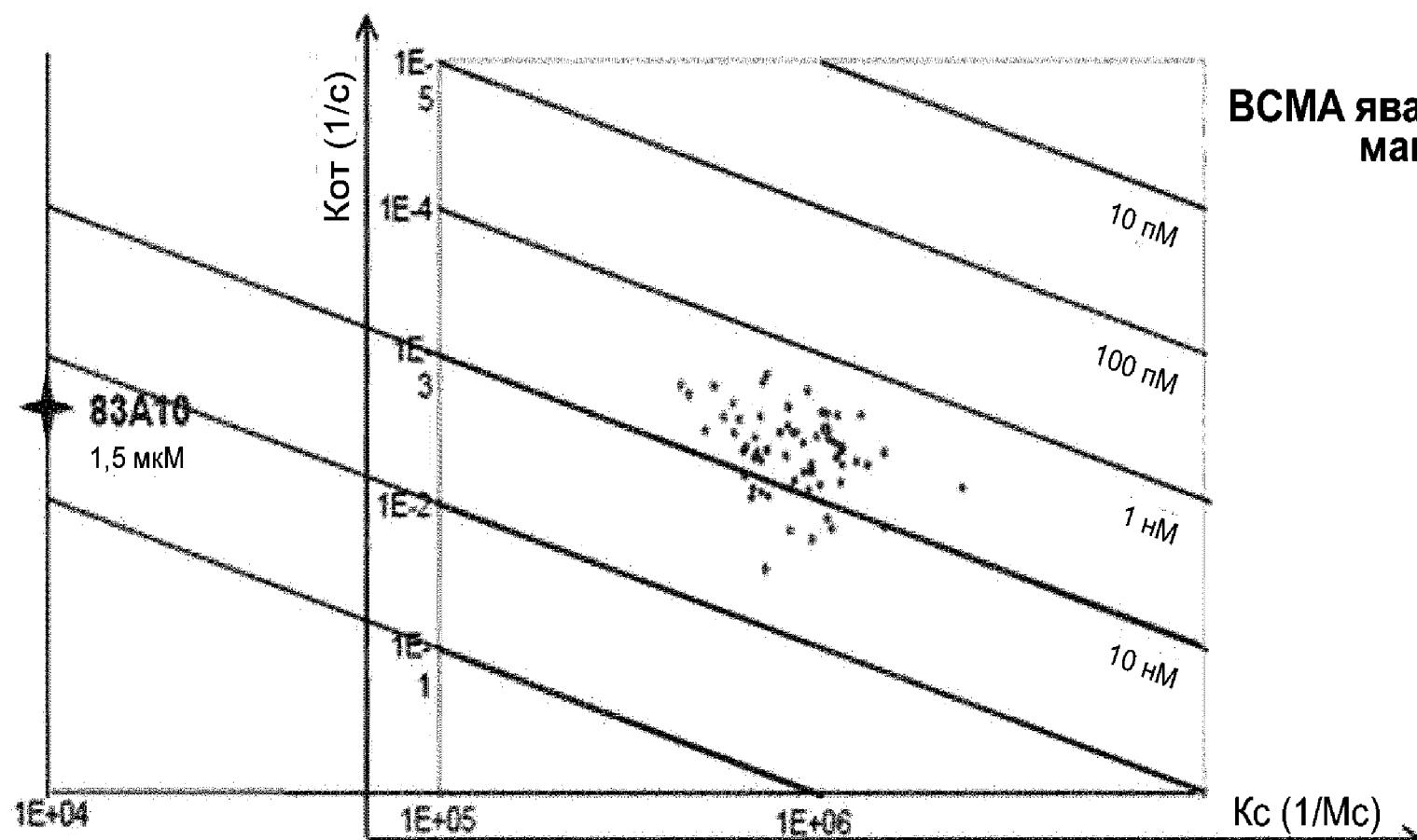
Фиг. 16



Фиг. 17
А



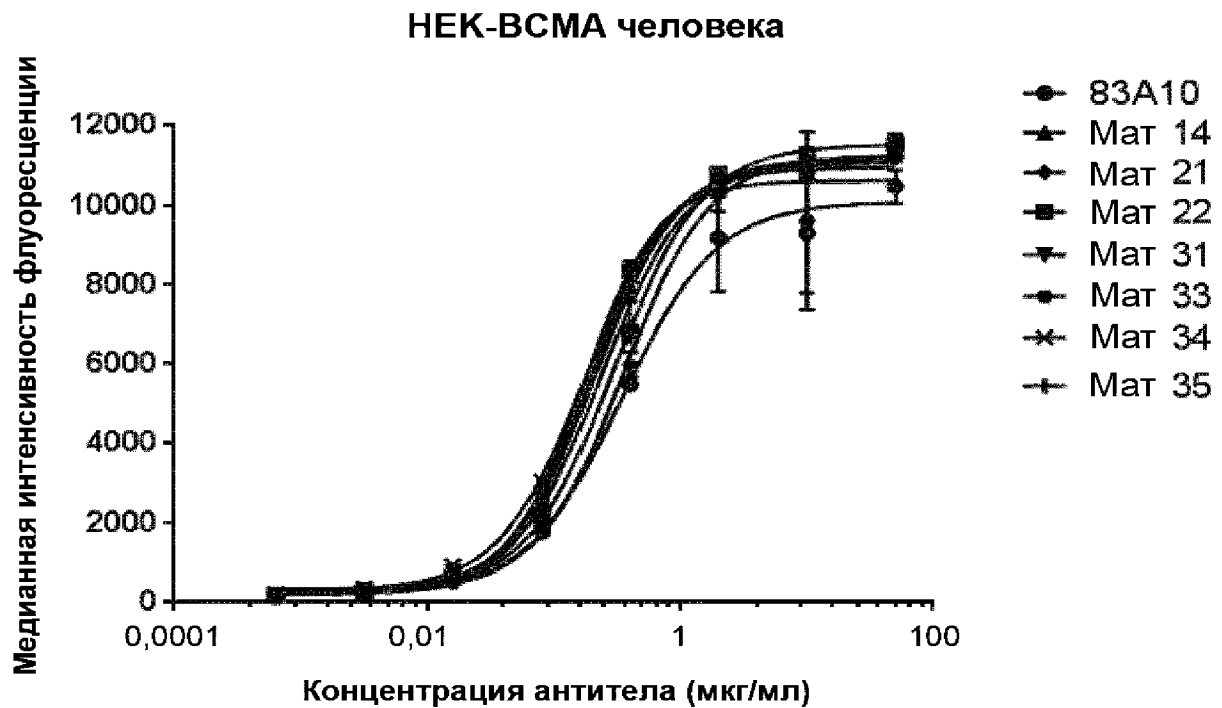
Фиг. 17
в



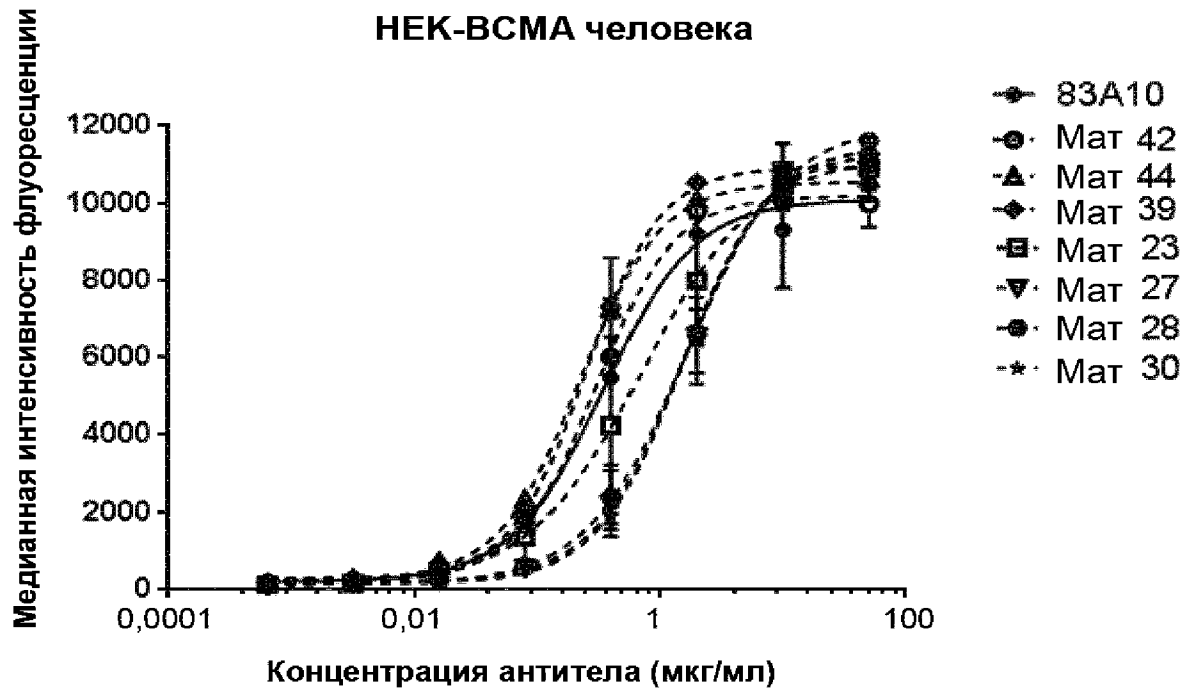
ВСМА яванск.
макака

Фиг. 18

А

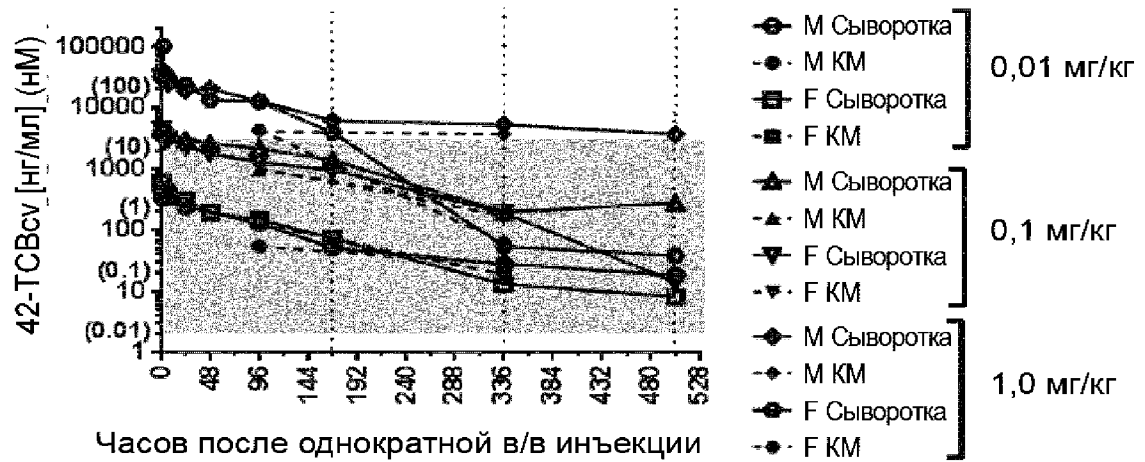


В

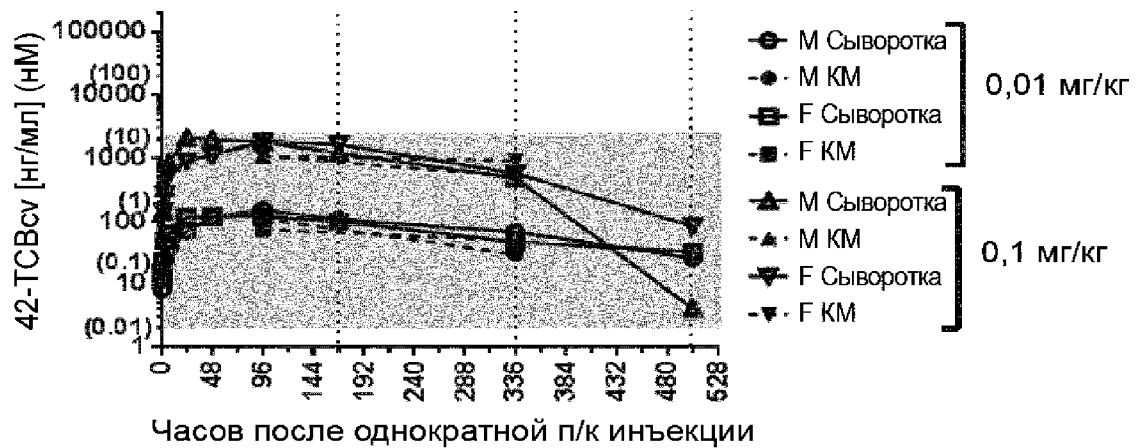


Фиг. 19

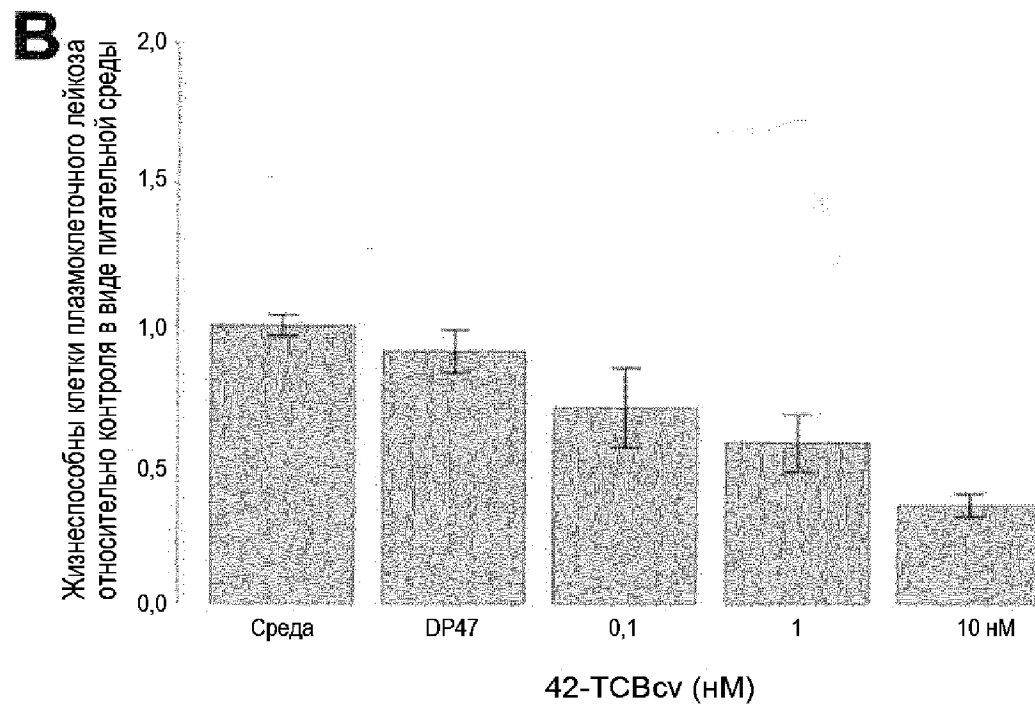
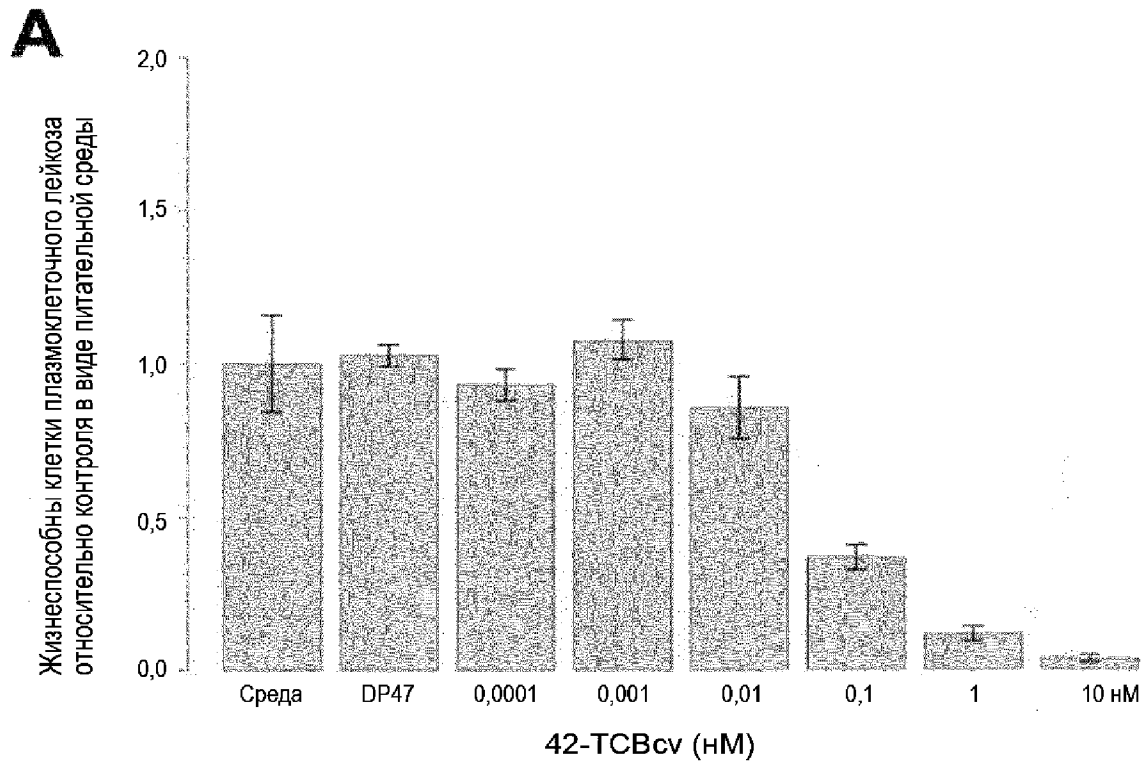
А. Концентрации 42-ТСВсу у яванского макака после однократной в/в инъекции



В. Концентрации 42-ТСВсу у яванского макака после однократной п/к инъекции

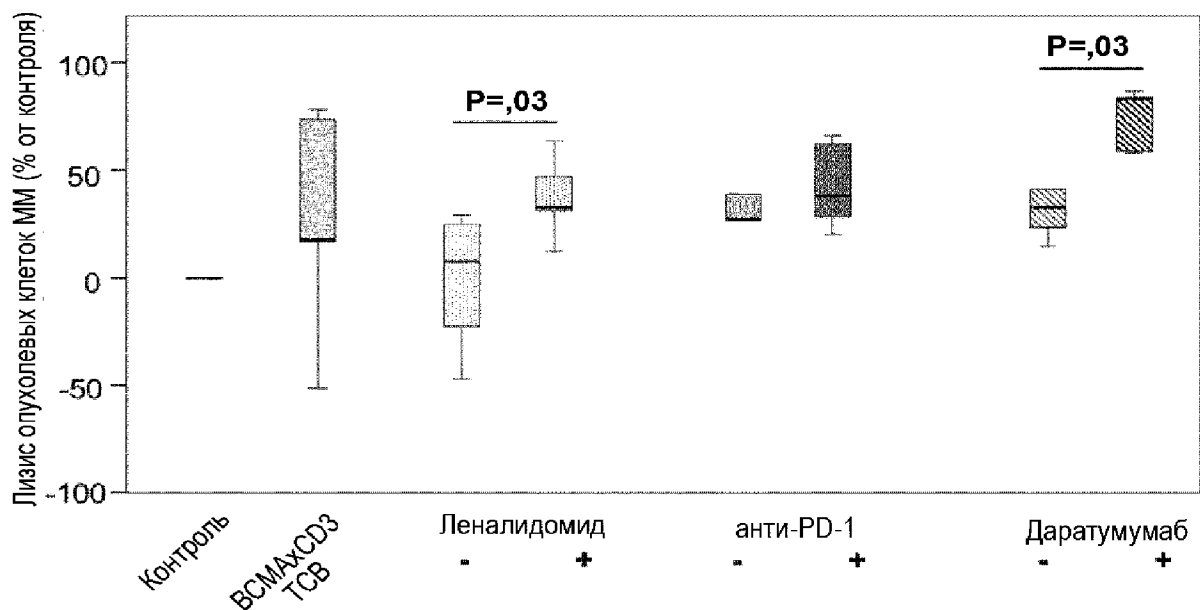


Фиг. 20



Фиг. 21

А.



В.

