

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21)

202090303

(13)

A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.31

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

(22) Дата подачи заявки
2015.03.18

(54) КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

(31) 61/955,663; 61/981,641; 62/007,385;
62/033,460

(32) 2014.03.19; 2014.04.18; 2014.06.03;
2014.08.05

(33) US

(62) 201691858; 2015.03.18

(71) Заявитель:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Дэвис Самьюэл, Смит Эрик, Варгиз
Бинду, Кишнер Джессика Р., Терстон
Гэвин (US)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены биспецифические антитела, которые связываются с CD3 и опухолевыми антигенами, а также способы их применения. В соответствии с определенными вариантами реализации биспецифические антитела согласно изобретению демонстрируют сниженные эффекторные функции и имеют уникальный профиль связывания в отношении Fcγ-рецепторов. Биспецифические антитела сконструированы так, чтобы эффективно индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. В соответствии с определенными вариантами реализации в настоящем изобретении предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает человеческий CD20, и Fc-домен, который связывает Fcγ-рецепторы со специфическим профилем связывания. В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению способны ингибировать рост В-клеточных или меланомных опухолей, экспрессирующих CD20. Биспецифические антитела согласно изобретению применимы для лечения различных видов рака, а также других связанных с CD20 заболеваний и нарушений.

A2**202090303****202090303****A2**

КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей в машиночитаемом формате в файле под названием A0015WO01-Sequence.txt, созданном 4 марта 2015 г. (83454 байт), включенный в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, нацеленным на антигены CD20 и CD3, а также способам уничтожения опухолей. Настоящее изобретение также относится к способам снижения и/или регулирования эффекторных функций, которые могут быть следствием связывания Fc, вместе с терапией антителами для лечения опухолей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Стратегии с двойным нацеливанием антител применяют в случае комплексных заболеваний, когда многофакторная модуляция помогает улучшить терапевтическую эффективность. CD20 представляет собой негликозилированный фосфопротеин, экспрессируемый на клеточных мембранах зрелых В-клеток. CD20 считается В-клеточным опухолеассоциированным антигеном, так как он экспрессируется более чем 95 % В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ) и другими В-клеточными злокачественными опухолями, но отсутствует на В-клетках-предшественниках, дендритных клетках и плазмменных клетках. Способы лечения рака посредством нацеливания на CD20 известны в данной области техники. Например, химерное анти-CD20 моноклональное антитело ритуксимаб применяли или предлагали к применению в лечении таких видов рака, как НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ). Считается, что анти-CD20 антитела уничтожают экспрессирующие CD20 опухолевые клетки посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или индукции апоптоза и повышения чувствительности к химиотерапии, хотя у некоторых пациентов развивалась устойчивость к анти-CD20 терапии или они демонстрировали неполные ответы на нее (например, устойчивость к ритуксимабу).

[004] CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген,

экспрессируемый на Т-клетках в ассоциации с комплексом рецепторов Т-клеток (РТК), необходимым для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется вследствие димерной ассоциации двух из четырех разных цепей: эпсилон, дзета, дельта и гамма. Биспецифические антитела, которые способны связывать CD3 и нацеливаться на антиген, такой как CD20, были предложены для терапевтического применения, в котором задействовано направление Т-клеточных иммунных ответов на ткани и клетки, экспрессирующие антиген-мишень.

[005] Биспецифическое антитело, содержащее CD20-связывающее плечо и CD3-связывающее плечо, может обеспечить необходимое взаимное влияние для повышения противоопухолевой активности. Третьим действующим элементом в таком биспецифическом антителе является Fc-домен. Модификация Fc-связывающих свойств может дополнительно повышать противоопухолевую эффективность терапевтического антитела.

[006] Связывание Fc-домена иммуноглобулина со своими рецепторами приводит к многочисленным сигнальным и иммунным ответам. Эти многочисленные «эффекторные функции», такие как КЗЦ и АЗКЗ, являются результатом образования иммуноглобулинами класса G (IgG) комплекса между Fab-доменом IgG и антиген-мишенью, при этом Fc-домен IgG связывается с Fc-рецепторами на эффекторных клетках. Некоторые эффекторные функции IgG не зависят от связывания антигена и включают такие функции, как циркулирующие сывороточные уровни и способность переносить Ig через барьеры. Другие эффекторные функции считаются важными для применения в иммуноглобулиновой терапии, такой как лечение рака. В частности, считается, что механизм АЗКЦ является одним из основных противоопухолевых механизмов терапевтических антител, уже имеющих в продаже, таких как растузумаб (метастатический рак молочной железы) и ритуксимаб (неходжкинская лимфома).

[007] Существующие на сегодня терапевтические стратегии, как правило, предполагают, что снижение эффекторных функций (или снижение связывания Fc-гамма-рецептора) может оказаться полезным для антител, чьей целью является нейтрализация или ингибирование биологической активности антигена (например, антитела-блокаторы или антагонисты) или активация или инициация нисходящей клеточной сигнализации (например, антитела-агонисты). Однако разработка нацеленных на опухоли антител со сниженной эффекторной функцией является нелогичной для опухолевой терапии, так как ожидается, что снижение цитотоксичности клеток-мишеней не будет эффективным в смысле лечения заболевания, т.е. разрушения опухолевых клеток или ингибирования роста опухолей.

[008] В одной описанной в данном документе стратегии применяется дифференциальное связывание Fc-рецептора в комбинации с биспецифическим связыванием антигена с конкретными целевыми опухолевыми маркерами, а также запуск опухолеспецифического Т-клеточного уничтожения. Fc-домен антитела сконструирован так, чтобы тщательно регулировать связывание Fc-рецептора, чтобы устранить или снизить нежелательное уничтожение клеток, таких как Т-клетки, естественные клетки-киллеры и макрофаги, несущие Fc-рецепторы. Уникальный профиль связывания в отношении взаимодействия Fc-рецептора, включающий взаимодействия связывания Fc γ RII-рецептора, но характеризующийся отсутствием взаимодействий Fc γ RI или Fc γ RIII, не был описан в данной области техники для нацеленной на опухоли Ig-терапии.

[009] Таким образом, комбинация биспецифических В-клеточных и Т-клеточных антител со сниженным связыванием с Fc-рецепторами приводит к неожиданно благоприятным терапевтическим свойствам. Биспецифические антитела, которые связывают как CD3, так и CD20 в особенности применимы в клинических условиях, когда необходимо специфическое нацеливание на CD20 с регулируемой и эффективной цитотоксичностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В первом аспекте в настоящем изобретении предложены биспецифические антитела с измененными связывающими Fc-доменами, которые связывают человеческие CD3 и CD20. Антитела в соответствии с этим аспектом изобретения применимы, помимо прочего, для нацеливания на Т-клетки, экспрессирующие CD3, и для стимуляции активации Т-клеток, например, в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение является преимущественным или необходимым в качестве части биспецифического антитела, которое направляет CD3-опосредованную активацию Т-клеток к конкретным типам клеток, таким как анти-CD20 опухолевые клетки. Дополнительно, антитела конструируют так, чтобы они обладали специфическими эффекторными функциями, которые не характерны для естественного репертуара иммунной системы.

[0011] Типовые анти-CD3/CD20 антитела согласно изобретению перечислены в Таблицах 1-8 в данном документе. В Таблице 1 приведены обозначения аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), а также определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типовых биспецифических антител. В Таблице 2 приведены обозначения последовательностей молекул нуклеиновых кислот, кодирующих

HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типовых биспецифических антител. В Таблице 3 приведены комбинации обозначений аминокислотных последовательностей типовых биспецифических антител, включая комбинации HCVR, константной области тяжелой цепи (CH) и LCVR. В Таблице 4 приведены обозначения комбинаций молекул нуклеиновых кислот, кодирующих комбинации HCVR, константную область тяжелой цепи (CH) и LCVR типовых биспецифических антител.

[0012] В Таблице 5 приведены обозначения аминокислотных последовательностей примеров тяжелых цепей согласно изобретению, в которых биспецифическое антитело содержит HCVR, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из Таблицы 5, спаренную с CH согласно изобретению. В Таблице 6 отдельно приведены обозначения аминокислотных последовательностей примеров легких цепей согласно изобретению, в которых биспецифическое антитело содержит LCVR, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из Таблицы 6.

[0013] В настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0014] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0015] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую пару аминокислотных последовательностей, находящихся в типовых анти-CD3/CD20 антителах, перечисленных в Таблице 1. В определенных вариантах реализации изобретения пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 и 10/18 (например, антитело 1 и антитело 2).

[0016] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи,

содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0017] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0018] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0019] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 (LCDR1) легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0020] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 (LCDR2) легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0021] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 (LCDR3) легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей L_{CDR}3, перечисленных в Таблице 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0022] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей H_{CDR}3 и L_{CDR}3 (H_{CDR}3/L_{CDR}3), содержащую аминокислотные последовательности H_{CDR}3, перечисленные в Таблице 1, спаренные с любой из аминокислотных последовательностей L_{CDR}3, перечисленных в Таблице 1, такую как пара аминокислотных последовательностей H_{CDR}3/L_{CDR}3, выбранная из группы состоящее из SEQ ID NO: 8/16 (например, антитело 1 или антитело 2).

[0023] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. H_{CDR}1-H_{CDR}2-H_{CDR}3-L_{CDR}1-L_{CDR}2-L_{CDR}3) из Таблицы 1. В определенных вариантах реализации изобретения группа аминокислотных последовательностей H_{CDR}1-H_{CDR}2-H_{CDR}3-L_{CDR}1-L_{CDR}2-L_{CDR}3 представляет собой SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24; или 12-14-16-20-22-24 (например, антитело 1 или антитело 2).

[0024] В связанном варианте реализации в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. H_{CDR}1-H_{CDR}2-H_{CDR}3-L_{CDR}1-L_{CDR}2-L_{CDR}3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей H_{CVR}/L_{CVR}, определенных для типовых антител, перечисленных в Таблице 1. Например, в настоящее изобретение включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу аминокислотных последовательностей H_{CDR}1-H_{CDR}2-H_{CDR}3-L_{CDR}1-L_{CDR}2-L_{CDR}3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей H_{CVR}/L_{CVR}, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 (например, антитело 1 или антитело 2). Методы и способы определения CDR в аминокислотных последовательностях H_{CVR} и L_{CVR} хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для выявления CDR в конкретных аминокислотных последовательностях H_{CVR} и/или L_{CVR}, раскрытых в данном документе. Типовые конвенции, которые можно использовать для определения границ CDR, включают, например, определение Кабата, определение Хотиа и определение AbM. В общих словах, определение Кабата основано на вариабельности последовательностей, определение Хотиа основано на расположении областей структурных петель, а определение AbM является компромиссом между подходами

Кабата и Хотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для определения последовательностей CDR в антителе доступны общие базы данных.

[0025] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их части, например, в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR или LCVR, перечисленные в Таблице 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей HCVR/LCVR, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0026] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности HCDR1 или HCDR2, или HCDR3, перечисленные в Таблице 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCDR1 или HCDR2, или HCDR3, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0027] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1 или LCDR2, или LCDR3, перечисленных в Таблице 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCDR1 или LCDR2, или LCDR3, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0028] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие HCVR, при этом HCVR содержит группу из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 соответствует определенным для типовых анти-CD3 антител, перечисленных в Таблице 1.

[0029] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие LCVR, при этом LCVR содержит группу из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-

LCDR3), при этом группа аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответствует определенным для типовых анти-CD3 антител, перечисленных в Таблице 1.

[0030] Также в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, а LCVR содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1. В определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности, полинуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности. В определенных вариантах реализации в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом HCVR и LCVR обе получены из одного анти-CD3 антитела, приведенного в Таблице 1.

[0031] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей CH, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0032] В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из нуклеотидных последовательностей CH, перечисленных в Таблице 2, или в значительной степени сходной последовательностью, имеющей с ними по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0033] Также в настоящем изобретении предложены рекомбинантные экспрессионные векторы, способные экспрессировать полипептид, содержащий переменную область

тяжелой или легкой цепи анти-CD3 антитела и вариабельную область тяжелой или легкой цепи анти-CD20 антитела. Например, в настоящее изобретение включены рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из вышеуказанных молекул нуклеиновых кислот, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих последовательности HCVR, LCVR и/или CDR и/или последовательности СН, приведенные в Таблице 1 и Таблице 2. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были внесены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, в которых возможна выработка антител или фрагментов антител, и выделения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

[0034] В другом аспекте в изобретении предложено терапевтически эффективное количество рекомбинантного человеческого антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD3 и CD20, при этом антитело содержит химерный Fc-домен и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/CD20 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте реализации изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который обеспечивает преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 антителом. Типовые агенты, которые обеспечивают преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 антителом, включают, без ограничений, другие агенты, которые связывают и/или активируют сигнализацию CD3 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или агенты, которые напрямую не связывают CD3, но, тем не менее, активируют иммунные клетки или стимулируют активацию иммунных клеток или повышают уничтожение опухоли. Дополнительные виды комбинированной терапии и совместные препараты, содержащие анти-CD3 антитела согласно настоящему изобретению, раскрыты в другом месте данного документа.

[0035] В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 и антиген-мишень, при этом молекула содержит химерный Fc-домен, имеющий сниженную эффекторную функцию. В определенном варианте реализации изобретения молекула содержит описанный в данном документе химерный Fc-домен. В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы связывают CD3 и CD20; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы называются в данном документе «анти-CD3/анти-CD20 биспецифическими молекулами». Анти-CD20 часть анти-CD3/анти-CD20

биспецифической молекулы используется для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют CD20 (например, В-клеточные опухоли), а анти-CD3 часть биспецифической молекулы используется для активации Т-клеток. Одновременное связывание CD20 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке опосредует направленное уничтожение (клеточный лизис) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой, которое облегчается эффекторными клетками, которые связывают химерный Fc-домен. Следовательно, анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению применимы, помимо прочего, для лечения заболеваний или нарушений, связанных или вызванных CD20-экспрессирующими опухолями (например, лимфомами и меланомными опухолями).

[0036] Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению дополнительно обеспечивают способ для регрессии CD20-положительных опухолей. Следовательно, в изобретении предложен способ лечения В-клеточного рака у субъекта, включающий введение терапевтического количества анти-CD3/анти-CD20 биспецифических молекул согласно изобретению, при этом количество является достаточным для снижения опухолевой нагрузки, регрессии опухоли или снижения развития опухоли у субъекта.

[0037] Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению дополнительно обеспечивают способ для подавления или регрессии CD20-положительной (т.е. CD20-экспрессирующей) меланомы. Следовательно, в изобретении предложен способ лечения CD20-положительной меланомы у субъекта, включающий введение терапевтического количества анти-CD3/анти-CD20 биспецифических молекул согласно изобретению, при этом количество является достаточным для ингибирования роста опухоли, снижения опухолевой нагрузки или замедления развития опухоли у субъекта.

[0038] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения или снижения интенсивности рака у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, а лечение или снижения интенсивности рака включает: (a) подавление роста опухоли у субъекта, (b) опосредование В-клеточного лизиса у субъекта, (c) лечение В-клеточного рака у субъекта, (d) лечение рака, положительного в отношении экспрессии CD20 у субъекта, или (e) лечение CD20-экспрессирующего меланомного рака у субъекта.

[0039] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение

биспецифического антитела для подавления роста опухоли у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов. В некоторых случаях подавление роста опухоли включает (a) ингибирование роста опухолей у субъекта, (b) уменьшение размера опухоли(ей) у субъекта или (c) уменьшение числа опухолей у субъекта.

[0040] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для опосредования В-клеточного лизиса у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов. В некоторых случаях В-клетки представляют собой пре-В-лимфоциты, зрелые В-лимфоциты или клетки В-клеточной неходжкинской лимфомы.

[0041] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения В-клеточного рака у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов. В некоторых случаях В-клеточный рак выбран из группы, состоящей из: фолликулярной лимфомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточной лимфобластной лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток и лимфомы Беркитта. В некоторых случаях субъект поражен опухолью, которая устойчива или не полностью восприимчива к (a) анти-CD20 моноспецифической монотерапии или (b) монотерапии ритуксимабом. В некоторых случаях субъект получал терапию анти-CD20 моноспецифическим антителом по меньшей мере от 1 дня до 1 года, перед введением биспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическая терапия включает или состоит в применении анти-CD20 моноспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическое антитело представляет собой ритуксимаб.

[0042] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения В-клеточного рака у субъекта, включающее: (a) выбор субъекта, который поражен раком, который устойчив или не полностью

восприимчив к анти-CD20 моноспецифической монотерапии; и (b) введение субъекту терапевтического количества биспецифического антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов.

[0043] В некоторых случаях субъект выбран на основании наличия опухоли, которая устойчива, не поддается или не полностью восприимчива к анти-CD20 моноспецифической терапии. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическая терапия включает или состоит в применении анти-CD20 моноспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическое антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых случаях В-клеточный рак представляет собой лимфому. В некоторых случаях лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ). В некоторых случаях В-клеточный рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

[0044] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения В-клеточного рака у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, а биспецифическое антитело вводят в количестве, достаточном для снижения опухолевой нагрузки, регрессии опухоли, ингибирования роста опухоли или замедления развития опухоли у субъекта.

[0045] В некоторых случаях В-клеточный рак выбран из группы, состоящей из: фолликулярной лимфомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточной лимфобластной лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток и лимфомы Беркитта. В некоторых случаях субъект поражен опухолью, которая устойчива или не полностью восприимчива к анти-CD20 моноспецифической монотерапии. В некоторых случаях субъект поражен опухолью, которая устойчива или не полностью восприимчива к монотерапии ритуксимабом. В некоторых случаях субъект получал терапию анти-CD20 моноспецифическим антителом по меньшей мере от 1 дня до 1 года, перед введением биспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическая терапия включает или состоит в применении анти-CD20 моноспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическое антитело представляет собой

ритуксимаб. В некоторых случаях количество, достаточное для снижения опухолевой нагрузки, регрессии опухоли, ингибирования роста опухоли или замедления развития опухоли у субъекта, составляет от около 0,001 мг/кг до около 1 мг/кг. В некоторых случаях количество, достаточное для снижения опухолевой нагрузки, регрессии опухоли или замедления развития опухоли у субъекта, составляет около 0,4 мг/кг.

[0046] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения рака, положительного в отношении экспрессии CD20, у субъекта, включающее: (a) выбор субъекта, который поражен раком и/или опухолями; (b) получение одного или более биологических образцов от субъекта; (c) определение CD20-экспрессирующего рака или опухолевых клеток в одном или более образцах; и (b) введение субъекту терапевтического количества биспецифического антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов.

[0047] В некоторых случаях субъект выбран на основании наличия рака или опухоли, которая устойчива, не поддается или не полностью восприимчива к анти-CD20 терапии. В некоторых случаях субъект выбран на основании наличия остаточного рака. В некоторых случаях анти-CD20 терапия включает или состоит в применении анти-CD20 моноспецифического антитела. В некоторых случаях анти-CD20 моноспецифическое антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых случаях рак представляет собой лимфому или лейкоз. В некоторых случаях лимфома выбрана из группы, состоящей из: фолликулярной лимфомы, В-клеточной лимфобластной лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток и лимфомы Беркитта. В некоторых случаях лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

[0048] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения CD20-экспрессирующего меланомного рака у субъекта, включающее введение терапевтического количества биспецифического антитела, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, при этом количество является достаточным для снижения опухолевой нагрузки, ингибирования роста опухоли или замедления развития опухоли у

субъекта.

[0049] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен. В настоящее изобретение включены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы (например, биспецифические антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с переменной областью легкой цепи (LCVR). В определенных типовых вариантах реализации изобретения каждый анти-CD3 антигенсвязывающий домен и анти-CD20 антигенсвязывающий домен содержит разные, отличные HCVR, спаренные с общей LCVR. Например, как проиллюстрировано в Примере 2 в данном документе, конструировали биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, при этом первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, полученную из анти-CD3 антитела; и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, при этом второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученную из анти-CD20 антитела, спаренную с LCVR, полученной из анти-CD3 антитела (например, той же LCVR, которая включена в анти-CD3 антигенсвязывающий домен). Другими словами, в типовых раскрытых в данном документе молекулах спаривание HCVR из анти-CD20 антитела с LCVR из анти-CD3 антитела приводит к получению антигенсвязывающего домена, который специфически связывает CD20 (но не связывает CD3). В таких вариантах реализации изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержат отличные анти-CD3 и анти-CD20 HCVR, но имеют общую анти-CD3 LCVR.

[0050] В настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в Таблице 1 или Таблице 2. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в Таблице 1 или Таблице 2. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, приведенных в Таблице 1 или Таблице 2. В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически

связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, приведенных в Таблице 1 или Таблице 2, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, приведенных в Таблице 1 или Таблице 2.

[0051] В соответствии с определенными вариантами реализации в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 10 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0052] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0053] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18.

[0054] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 16 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 24 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0055] В определенных вариантах реализации изобретения первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16/24.

[0056] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 12 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 14 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 20 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 22 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0057] Некоторые неограничивающие типовые анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24.

[0058] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0059] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18 или в

значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности. Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 75 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0060] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую SEQ ID NO: 2/18 или SEQ ID NO: 2/75.

[0061] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 24 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0062] В определенных вариантах реализации изобретения второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 8/24.

[0063] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по

меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

[0064] Некоторые неограничивающие типовые анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (например, антитело 1 или антитело 2).

[0065] В одном варианте реализации изобретения анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен (A1), который специфически связывает человеческий CD3 и содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2, A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2, A1-LCDR3), и второй антигенсвязывающий домен (A2), который специфически связывает человеческий CD20 и содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3); при этом: (a) A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (b) A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (c) A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; (d) A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (e) A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (f) A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (g) A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (h) A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (i) A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (j) A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (k) A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и (l) A2-LCDR3 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

[0066] В связанном варианте реализации изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в последовательностях вариабельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR) SEQ ID NO: 2/18.

[0067] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR раскрытых в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифических антигенсвязывающих молекул, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотидные последовательности, приведенные в данном документе в Таблицах 2, 7 и 8, а также молекулы нуклеиновых кислот, содержащие две полинуклеотидные последовательности, приведенные в Таблицах 2, 7 и 8, в любой функциональной комбинации или аранжировке. Также в изобретение включены рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие нуклеиновые кислоты согласно изобретению, и клетки-хозяева, в которые были внесены такие векторы, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, в которых возможна выработка антител, и выделения полученных антител.

[0068] Настоящее изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых любой из вышеуказанных антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD3, скомбинирован, связан или каким-либо другим образом ассоциирован с любым из вышеуказанных антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD20, с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD3 и CD20.

[0069] В другом аспекте в изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов. В связанном аспекте биспецифическое антитело способно специфически связываться с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB. В настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые предпочтительно связываются с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB и проявляют слабую аффинность связывания или отсутствие аффинности связывания в отношении человеческого FcγRI или человеческого FcγRIII. В одном аспекте биспецифические антитела способны специфически связываться с человеческим FcγRIIA с более высокой аффинностью, чем в отношении связывания человеческого FcγRIIB,

человеческого Fc γ RI и/или человеческого Fc γ RIII, согласно данным *in vitro* анализа. Биспецифические антитела согласно изобретению способны специфически связываться с человеческим Fc γ RIIA и человеческим Fc γ RIIB с более высокой аффинностью, чем эти антитела связываются с человеческим Fc γ RI или человеческим Fc γ RIII, согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело специфически связывается как с человеческим Fc γ RIIA, так и с человеческим Fc γ RIIB, и демонстрирует аффинность связывания, соответствующую K_d менее 1 мкМ, в отношении каждого из человеческого Fc γ RI и человеческого Fc γ RIII, согласно данным *in vitro* анализа.

[0070] В других аспектах в изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый и второй полипептид тяжелой цепи, каждый из которых содержит и химерный Fc-домен, при этом первый полипептид тяжелой цепи содержит антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, а второй полипептид тяжелой цепи содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20.

[0071] В других вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует более высокую, т.е. более сильную аффинность связывания в отношении человеческого Fc γ RIIA по сравнению с его связыванием с человеческим Fc γ RIIB согласно данным *in vitro* анализа. В других вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим Fc γ RIIA и демонстрирует более низкое значение K_d по сравнению с его связыванием с человеческим Fc γ RIIB согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим Fc γ RIIA при 25 °C со значением K_d между 10 и 30 мкМ согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим Fc γ RIIB при 25 °C со значением K_d между 100 и 250 мкМ согласно данным *in vitro* анализа.

[0072] В другом варианте реализации изобретения антитело демонстрирует низкую или не демонстрирует выявляемую аффинность связывания в отношении человеческого Fc γ RI согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует низкую или не демонстрирует выявляемую аффинность связывания в отношении человеческого Fc γ RIII согласно данным *in vitro* анализа.

[0073] В некоторых вариантах реализации изобретения *in vitro* анализ представляет собой анализ методом поверхностного плазмонного резонанса.

[0074] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности.

[0075] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует незначительную или не демонстрирует выявляемую антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

[0076] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует сниженную комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности.

[0077] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует менее чем 50 %-ную цитотоксичность согласно данным по клеточному лизису, полученным в *in vitro* анализе.

[0078] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует незначительную или не демонстрирует выявляемую комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

[0079] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело индуцирует снижение опосредованного Т-клетками уничтожения клеток, несущих Fc-рецепторы, таких как NK-клетки или макрофаги, по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа.

[0080] В определенных вариантах реализации изобретения антитело индуцирует снижение уничтожения Т-клеток, опосредованного клетками, несущими Fc-рецепторы, такими как NK-клетки или макрофаги, по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа.

[0081] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует более сильную аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA, чем его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIB, которая сильнее, чем его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRI, которая сильнее или равна его аффинности связывания в отношении человеческого FcγRIII, согласно определению путем измерения K_d в *in vitro* анализе. В других вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA > человеческого FcγRIIB > человеческого FcγRI >= человеческого FcγRIII согласно данным *in vitro* анализа.

[0082] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует более сильную аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA, чем его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIB, которая сильнее, чем его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIII, которая сильнее или равна его аффинности связывания в отношении человеческого FcγRI, согласно определению путем измерения K_d в *in vitro* анализе. В других вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA >

человеческого FcγRIIB > человеческого FcγRIII >= человеческого FcγRI согласно данным *in vitro* анализа.

[0083] В некоторых вариантах реализации изобретения человеческий FcγRIII представляет собой человеческий FcγRIIIA или человеческий FcγRIIIB.

[0084] В некоторых вариантах реализации изобретения химерный Fc-домен содержит химерную шарнирную область.

[0085] В другом аспекте в настоящем изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, второй антигенсвязывающий домен и химерную константную область тяжелой цепи (CH), при этом (a) первый антигенсвязывающий домен связывает CD3, (b) второй антигенсвязывающий домен связывает CD20. В определенных аспектах изобретения химерная CH-область связывается с более высокой, т.е. более сильной аффинностью с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа. В другом аспекте химерная CH связывается с более низкой, т.е. более слабой или отсутствующей аффинностью с человеческим FcγRI и человеческим FcγRIII по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа.

[0086] В изобретении предложены биспецифические антитела, содержащие химерную шарнирную область. В некоторых аспектах химерная шарнирная область содержит остатки аминокислотной последовательности от позиции 216 до 236 (нумерация EU). Биспецифические антитела согласно изобретению сконструированы так, чтобы химерная шарнирная область содержала аминокислотную последовательность нижней шарнирной области человеческого IgG2 PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) от позиции 228 до 236 (нумерация EU). В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению содержат химерную шарнирную область, а часть верхней шарнирной области химерной шарнирной области содержит аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 (нумерация EU) верхней шарнирной области IgG1. В других вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению содержат химерную шарнирную область, а часть верхней шарнирной области химерной шарнирной области содержит аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 (нумерация EU) верхней шарнирной области IgG4.

[0087] В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность химерной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53). В другом варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность

химерной шарнирной области ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54). В определенных вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность домена CH2 человеческого IgG4 от позиции 237 до 340 (нумерация EU). В других вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит домен CH3, полученный из домена CH3 человеческого IgG1 или домена CH3 человеческого IgG4. В других вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит домен CH1 человеческого IgG1 и домен CH3 человеческого IgG1. В дополнительных вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит домен CH1 человеческого IgG4 и домен CH3 человеческого IgG4.

[0088] В аспекте изобретения предложен способ получения биспецифического антитела, содержащего химерную константную область тяжелой цепи, включающий: (a) трансфицирование клетки-хозяина молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую легкую цепь, способную связывать антиген CD3, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-область первой легкой цепи, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CL-область Ig, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-область выбранного антиген-специфического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны между собой; (b) трансфицирование клетки-хозяина с этапа (a) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь антитела, способную связывать антиген CD3, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную константную CH-область человеческого Ig, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-область, и нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально связаны между собой; при этом CH-область кодирует одну или более аминокислотных модификаций в домене CH3, которые снижают или устраняют связывание второго домена CH3 с протеином A; (c) трансфицирование клетки-хозяина с этапа (a) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь антитела, способную связывать антиген CD20, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную CH-область человеческого Ig, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-область, и нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально связаны между собой; и (c) получение указанного антитела путем совместной экспрессии молекул

нуклеиновых кислот согласно (a) и (b) в указанной клетке-хозяине.

[0089] В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ получения биспецифического антитела путем: (a) трансфицирования клетки-хозяина (i) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую LCVR, содержащую SEQ ID NO:18, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную C_L-область Ig, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область LCVR антитела, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей C_L-область Ig; (b) трансфицирования клетки-хозяина с этапа (a) (i) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь указанного антитела, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую HCVR, содержащую SEQ ID NO:10, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную C_H-область IgG, при этом нуклеотидная последовательность, кодирующая C_H-область, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая HCVR, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей C_H-область; и (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь указанного антитела, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую HCVR, содержащую SEQ ID NO:2, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную C_H-область IgG, при этом нуклеотидная последовательность, кодирующая C_H-область, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая HCVR, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей C_H-область; и (c) получения указанного антитела путем совместной экспрессии молекул нуклеиновых кислот согласно (a) и (b) в указанной клетке-хозяине. В некоторых случаях способ дополнительно включает этапы культивирования клетки-хозяина с этапа (b), при этом антитело секретируется в клеточную культуральную среду; и выделение антитела из клеточной культуральной среды.

[0090] В некоторых аспектах способ получения биспецифического антитела необязательно включает трансфицирование клетки-хозяина с этапа (a) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую легкую цепь, способную связывать антиген CD20, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-область второй легкой цепи, и нуклеотидную

последовательность, кодирующую константную CL-область Ig, при этом указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-область второй легкой цепи, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны между собой.

[0091] В некоторых вариантах реализации изобретения первая тяжелая цепь содержит CH3-область, содержащую модификацию H95R (согласно нумерации экзонов по IMGT; H435R согласно нумерации EU). В другом варианте реализации изобретения первая тяжелая цепь содержит CH3-область, дополнительно содержащую модификацию Y96F (IMGT; Y436F согласно нумерации EU). В дополнительных вариантах реализации изобретения способ включает выделение антитела при помощи протеина А.

[0092] В другом аспекте изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее: (а) первую тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающий домен, способный распознавать и связывать первый антиген-мишень, (b) вторую тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающий домен, способный распознавать и связывать второй антиген-мишень, и (с) общий антигенсвязывающий домен легкой цепи, способный распознавать и связывать первый или второй антиген-мишень, при этом тяжелая цепь согласно (а) или (b) или как (а), так и (b) содержит константную область тяжелой цепи (CH), содержащую химерную шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

[0093] В определенных вариантах реализации изобретения константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах реализации изобретения кодирующая химерную CH-область нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность химерной CH-области кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность CH-области содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33.

[0094] В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую легкую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34.

[0095] В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 36.

[0096] В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39.

[0097] В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41.

[0098] В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 43.

[0099] В другом аспекте в изобретении предложено терапевтически эффективное количество раскрытой в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы и второго терапевтического агента. В одном варианте реализации изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который обеспечивает преимущество в комбинации с анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулой. Типовые агенты, которые могут обеспечивать преимущество в комбинации с анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулой, подробно обсуждаются в другом месте данного документа.

[00100] В другом аспекте в изобретении предложены терапевтические способы для таргетирования/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, при помощи анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению, при этом терапевтические способы включают введение терапевтически

эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-CD3/анти-CD20 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых случаях биспецифическая антигенсвязывающая молекула (например, антитело) связывает человеческие клетки, экспрессирующие CD20, или связывает человеческие В-клетки.

[00101] В другом аспекте в изобретении предложены биспецифические антитела, при этом антитело: связывает человеческие клетки, экспрессирующие человеческий CD3, и клетки яванского макака, экспрессирующие CD3 яванского макака; связывает человеческие Т-клетки или Т-клетки яванского макака; связывается с CD3-экспрессирующими человеческими Т-клетками со значением EC_{50} между 1×10^{-12} М и 1×10^{-6} М; связывается с CD3-экспрессирующими человеческими Т-клетками со значением EC_{50} между 1×10^{-9} М и 1×10^{-8} М; связывается с CD20-экспрессирующими человеческими В-клетками со значением EC_{50} между 1×10^{-12} М и 1×10^{-6} М; связывается с CD20-экспрессирующими человеческими В-клетками со значением EC_{50} между 1×10^{-9} М и 1×10^{-8} М; или усиливает опосредованную Т-клетками цитотоксичность человеческих В-клеток, которые устойчивы или невосприимчивы к анти-CD20-опосредованной цитотоксичности.

[00102] В различных способах или применениях настоящего изобретения одно введение биспецифического антитела субъекту в дозе, составляющей по меньшей мере около 0,01 мг/кг, приводит к снижению числа В-клеток у субъекта до уровня ниже выявляемого через около 2 дня после введения биспецифического антитела субъекту. В некоторых случаях число В-клеток остается на уровне ниже выявляемого в течение по меньшей мере около 7 дней после введения субъекту одной дозы, составляющей по меньшей мере около 0,01 мг/кг биспецифического антитела.

[00103] Настоящее изобретение включает применение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению для таргетирования/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, и в производстве медикамента для лечения заболевания или нарушения, связанного с или вызванного экспрессией CD20. В некоторых случаях биспецифическое антитело согласно изобретению применяют в производстве медикамента для лечения или уменьшения интенсивности рака у субъекта, при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, а лечение или снижения интенсивности рака включает: (a) подавление роста опухоли у субъекта, (b) опосредование В-клеточного лизиса у субъекта, (c) лечение В-клеточного

рака у субъекта, (d) лечение рака, положительного в отношении экспрессии CD20, у субъекта, или (e) лечение CD20-экспрессирующего меланомного рака у субъекта.

[00104] Настоящее изобретение также включает биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, второй антигенсвязывающий домен и химерную константную область тяжелой цепи (CH), при этом: первый антигенсвязывающий домен связывает CD3, второй антигенсвязывающий домен связывает CD20, химерная CH-область связывается с более высокой, т.е. более сильной аффинностью с человеческим FcγR1A и человеческим FcγR1B, по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, причем такое биспецифическое антитело предназначено для применения в производстве медикамента. В изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, и химерную CH-область, которая связывается с более высокой, т.е. более сильной аффинностью с человеческим FcγR1A, чем она связывается с человеческим FcγR1B, для применения в производстве медикамента.

[00105] Другие варианты реализации изобретения станут понятны после прочтения нижеследующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00106] **Фигура 1** иллюстрирует аминокислоты шарнирной области, применяемые при конструировании химерных шарнирных областей, и соответствующую систему нумерации аминокислот.

[00107] На **Фигуре 2** представлено аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG1, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанную как IGHG1 в UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01857 (SEQ ID NO: 45).

[00108] На **Фигуре 3** представлено аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG2, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанную как IGHG2 в UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01859 (SEQ ID NO: 46).

[00109] **Фигура 4** представлено аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанную как IGHG4 в UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01861 (SEQ ID NO: 47).

[00110] **Фигуры 5A и 5B:** Кривые доза-ответ, иллюстрирующие отсутствие активности КЗЦ в отношении клеток Daudi (ФИГ. 5A) и Raji (ФИГ. 5B) в присутствии антител, имеющих шарнирные CH-области дикого типа или химерные шарнирные CH-области. («Контрольное» антитело 4 = биспецифическое антитело с дт IgG1 CH; антитело 1;

антитело 2; изотипический контрольный IgG1 = неспецифическое антитело с дт IgG1 C_H).

[00111] Фигуры 6А и 6В: Кривые доза-ответ, иллюстрирующие отсутствие активности АЗКЦ в отношении клеток Daudi (ФИГ. 6А) и Raji (ФИГ. 6В) в присутствии антител, имеющих шарнирные C_H-области дикого типа или химерные шарнирные C_H-области. («Контрольное» антитело 4 = биспецифическое антитело с дт IgG1 C_H; антитело 1; антитело 2; изотипический контрольный IgG1 = неспецифическое антитело с дт IgG1 C_H).

[00112] Фигуры 7А-7F иллюстрируют объем опухолей (в мм³) в течение времени у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК (или контрольную смесь без МКПК – Фиг. 7D), при этом CD3хCD20 биспецифическое антитело согласно изобретению (Ab1) или базовый раствор, или контрольное антитело вводили после имплантации и обработки опухоли, начиная с дня имплантации опухоли (день 0), а измерения проводили в течение всего исследования. Фиг. 7А: ни одна из мышей не демонстрировала ингибирование роста опухоли при обработке базовым раствором; Фиг. 7В: 1 из 5 (1/5) мышей демонстрировала ингибирование роста опухоли при обработке 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab); Фиг. 7С: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,4 мг/кг антитела 1 (Ab1); Фиг. 7D: 0/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли в случае, когда не имплантировали МКПК, и при обработке 0,4 мг/кг Ab1; Фиг. 7Е: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,04 мг/кг Ab1; и Фиг. 7F: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,004 мг/кг Ab1.

[00113] Фигуры 8А и 8В иллюстрируют объем опухолей (в мм³) в течение времени у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК и обрабатывали Ab1 (CD3хCD20-химерный Fc) по сравнению с базовым раствором, с или без введения IgG (Фиг. 8А), или обрабатывали Ab4 (CD3хCD20-дт Fc) по сравнению с базовым раствором, с или без введения IgG (Фиг. 8В). В этой модели оба CD3хCD20 биспецифических антитела демонстрировали значительное ингибирование роста опухолей без введения IgG. Как видно на Фиг. 8А, в этом эксперименте CD3хCD20-химерный Fc биспецифическое антитело (Ab1) демонстрирует полное ингибирование роста опухолей без введения IgG в течение всего времени исследования.

[00114] Фигура 9 иллюстрирует регрессию развившихся опухолей (~200-400 мм³) на 14-й день у мышей NSG, обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом. Мышам NSG подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК за 15 дней до обработки, чтобы позволить опухолям развиваться. Мышей подкожно обрабатывали 0,4 мг/кг антитела 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело) или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или контрольным базовым раствором один раз в неделю (день 7, день 14,

день 21).

[00115] Фигура 10 иллюстрирует регрессию развившихся опухолей (~500-900 мм³) на 21-й день у мышей NSG, обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом. Мышам NSG подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК за 15 дней до обработки, чтобы позволить опухолям развиваться. Мышей обрабатывали 0,4 мг/кг антитела 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело) или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab) один раз в неделю (день 7, день 14, день 21).

[00116] Фигуры 11А и 11В иллюстрируют *in vivo* эффективность введения CD3хCD20 биспецифического антитела – антитела 1 и антитела 4 – по сравнению с введением моноспецифического антитела (ритуксимаба) путем определения изменения уровней В-клеток CD20+ или уровней Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков на 7 день исследования. Антитела или плацебо вводили на день 0. Фиг. 11 А: уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день во всех образцах за исключением плацебо; Фиг. 11В: В периферической крови животных, обработанных биспецифическими антителами, на 2 день наблюдали временное снижение числа Т-клеток, которое восстанавливалось до исходного уровня на 4 день. Для обработанных плацебо или ритуксимабом (Ритуксаном) групп не наблюдали снижение числа Т-клеток (ниже исходного уровня).

[00117] Фигуры 12А и 12В иллюстрируют *in vivo* эффективность введения CD3хCD20 биспецифического антитела – антитела 1 и антитела 4 – путем определения изменения уровней В-клеток CD20+ или уровней Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков в течение длительного (3 месяца) исследования. Плацебо (базовый раствор) или биспецифические антитела вводили при 1,0 мг/кг на день 0. Фиг. 12А: уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день и оставались сниженными в течение всего исследования во всех образцах за исключением плацебо; Фиг. 12В: Для животных, обработанных биспецифическими антителами, на 2 день наблюдали временное снижение числа Т-клеток, которое восстанавливалось до исходного уровня на 4 день и оставалось в пределах исходного уровня в течение всего исследования (> 80 дней). Для обработанных плацебо животных не наблюдали временное снижение числа Т-клеток.

[00118] Фигуры 13А и 13В иллюстрируют *in vivo* эффективность введения низкой дозы CD3хCD20 биспецифического антитела – антитела 1 и антитела 4 – путем определения изменения уровней В-клеток CD20+ или уровней Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков в течение длительного (2 месяца) исследования. Биспецифические антитела вводили при 0,01 мг/кг или 0,001 мг/кг (1 мкг/кг) на день 0. Фиг. 13А: уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день и оставались

сниженными в течение всего исследования, как наблюдалось у животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (См. также Фигуры 11А или 12А); Фиг. 13В: Животные, обработанные очень низкими дозами (1 мкг/кг) биспецифических антител демонстрировали такое же временное снижение числа Т-клеток и восстановление, которое наблюдалось у животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (См. также Фигуры 11В или 12В).

[00119] Фигура 14 показывает корреляцию снижения числа В-клеток со снижением числа антител в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc антителом 1. В то время как число антител (неокрашенные символы) в системе циркуляции животных снижено в течение всего времени, популяции В-клеток (окрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдали на 81 день для животного № I06881 (окрашенный круг)).

[00120] Фигура 15 показывает корреляцию снижения числа В-клеток со снижением числа антител в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc антителом 2. В то время как число антител (неокрашенные символы) в системе циркуляции животных снижается со временем, популяции В-клеток (окрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдали на 66 день для животного № I06876 (окрашенный треугольник), и на 68 день для животного № I06877 (окрашенный квадрат)).

[00121] Фигура 16 показывает корреляцию снижения числа В-клеток со снижением числа антител в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-дт Fc (Ab 4) биспецифическим антителом. В то время как число антител (неокрашенные символы) в системе циркуляции животных снижается со временем, популяции В-клеток (окрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдали на 91 день для животного № I06870 (окрашенный треугольник), и на 64 день для животного № I06872 (окрашенный квадрат)).

[00122] Фигуры 17А и 17В показывает корреляцию снижения числа тканевых В-клеток в селезенке (Фиг. 17А) или мезентериальных лимфатических узлах (Фиг. 17В) у яванских макаков в результате введения CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом, с введением намного более низких доз (доз от 0,01 до 1,0 мг/кг) в биспецифических группах. Это снижение не наблюдали в какой-либо ткани в контрольной плацебо-группе животных. Оба CD3хCD20 биспецифических антитела (Ab 1 и Ab 4) приводили к дозозависимому снижению числа В-клеток в лимфоидных органах, а в случае доз, равных или превышающих 0,1 мг/кг биспецифические антитела снижали число В-клеток более эффективно, чем ритуксимаб.

[00123] **Фигуры 18А и 18В** иллюстрируют, что CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию человеческих МКПК (Фиг. 18А) или МКПК яванских макаков (Фиг. 18В) в *in vitro* биоанализе, в то время как контрольное антитело 5 (-▲-; не специфическое в отношении CD3хCD20) не демонстрировало активность.

[00124] **Фигуры 19А и 19В** иллюстрируют опосредованное CD3хCD20 целевое уничтожение Raji в анализе цитотоксичности. Антитело 1 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC₅₀, составляющими 25,0 пМ и 9,10 пМ для Т-клеток человека (Фигура 19А) и яванского макака (Фигура 19В), соответственно. Антитело 4 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC₅₀, составляющими 15,7 пМ и 1.73 пМ для Т-клеток человека (Фигура 19А) и яванского макака (Фигура 19В), соответственно. Активность контрольного (-▲-) антитела не наблюдали.

[00125] **Фигуры 20А и 20В** иллюстрируют, что CD3хCD20 биспецифическое антитело опосредует уничтожение клеток наивными Т-клетками. На Фигуре 20А показан типовой график разброса FACS при наиболее высокой исследуемой концентрации антитела 4. Клетки B16F10.9 дикого типа метили CFDA-SE, а клетки B16F10.9/CD20 метили Violet Cell Tracker. Эффекторные клетки не метили. На второй панели Фиг. 20А показано, что происходит уничтожение CD20-экспрессирующих клеток (нижний правый квадрант) вследствие обработки анти-CD3хCD20. На Фигуре 20В показана доля выживших клеток B16F10.9/CD20 через 48 часов в присутствии CD20хCD3 антител, т.е. антитела 4 (дт Fc), антитела 1(химерный Fc) или контрольного Ab 5, и МКПК. Процент выживаемости определяли, сравнивая процентную долю клеток B16F10.9/CD20 с CD20-отрицательными клетками B16F10.9 в популяции живых клеток. Ab 4 и Ab 1 специфическим образом направляли человеческие Т-клетки для уничтожения только клеток-мишеней, экспрессирующих CD20 (Фигура 20В) в смешанной популяции клеток. Целевое уничтожение клеток наблюдали только в присутствии биспецифических антител, при этом снижение числа клеток B16F10.9/CD20 происходило дозозависимым образом в результате действия антитела 4 (EC₅₀ 12,8 пМ) и антитела 1 (EC₅₀ 19,5 пМ) (Фигура 20В). Менее 5 % CD20-экспрессирующих клеток оставалось живыми при наибольшей исследуемой дозе (10 мкг/мл).

[00126] На **Фигуре 21** показана процентная доля активированных клеток (CD69+) из общего числа эффекторных клеток CD2+ в 48-часовом анализе цитотоксичности с нацеливанием на клетки B16F10.9/CD20, при этом такую активацию индуцировало любое CD20хCD3 антитело, т.е. антитело 4 (дт Fc) или антитело 1 (химерный Fc).

[00127] **Фигуры 22А и 22В** иллюстрируют, что CD3хCD20 биспецифическое антитело

индуцировало кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями (клетками CD20+) посредством своих биспецифических связывающих плеч. Эффекторные клетки окрашивали CFSE, а клетки CD20+ окрашивали Violet Cell Tracker, а данные наносили на отдельные квадранты. После инкубации с нерелевантным контрольным антителом (контрольное антитело 5) в смеси клеток не происходило никакой кластеризации (двойное окрашивание) (Фиг. 22А). После инкубации с CD3хCD20 биспецифическим антителом (Ab 4) проявлялись клеточные кластеры, так как они окрашены как CFSE, так и Violet (См. верхний левый квадрант на графике разброса на Фиг. 22В, участок, выделенный жирным квадратом).

[00128] Фигура 23 иллюстрирует исследование объема опухолей (в мм³) у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК, в котором CD3хCD20 биспецифическое антитело согласно изобретению (Ab 1) при 0,4 мг/кг, 2Х/неделю (в.б.), нерелевантное контрольное антитело Ab 6 при 0,4 мг/кг, 2Х/неделю (в.б.) или базовый раствор сравнивали с ритуксимабом – анти-CD20 антителом при 8 мг/кг, 5Х/неделю (в.б.), и CD19хCD3 BiTE при 0,5 мг/кг, 5Х/неделю (в.в.). (Информацию по CD19хCD3 BiTE См. в Nagorsen D, et al. *Pharmacol Ther.* 2012 Dec;136(3):334-42, 2012). Обработку проводили для мышей с развившимися опухолями (~100-500 мм³). Данные выражали в виде среднего (СПС) и проводили анализ ANOVA. Ab1, дозирование которым проводили 2х в неделю в.б., было сравнимо по эффективности с CD19хCD3 BiTE, дозирование которым проводили 5х/неделю в.в. в этой *in vivo* модели.

[00129] Фигура 24 иллюстрирует исследование объема опухолей (в мм³) у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь Raji/МКПК аналогично с Фигурой 23, при этом анализ ANOVA проводили для Ab 1, контрольного Ab 6, ритуксимаба и контрольного базового раствора. Ab 1, дозирование которого проводили 2х в неделю, превосходило терапию ритуксимабом (дозирование которого проводили при 8 мг/кг; 5х/неделю в.б.) в подавлении развившихся опухолей Raji.

[00130] Фигуры 25А и 25В иллюстрируют замедление роста опухолей в случае начала обработки одновременно или после трансплантации опухоли hCD20/B16F10.9 гуманизированным мышам, обрабатываемым CD3хCD20 биспецифическим антителом. Фиг. 25А: мышам hCD3 подкожно имплантировали hCD20-трансдуцированные клетки меланомы B16F10.9 и одновременно обрабатывали 0,004 мг/кг или 0,4 мг/кг антитела 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело), или 4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FcD1 Ab), или контрольным базовым раствором (в.б. 2 раза в неделю). Фиг. 25В: мышам hCD3 подкожно имплантировали клетки меланомы hCD20/B16F10.9, а развившиеся опухоли обрабатывали на 10 день и далее антителом 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело) или контролем.

Мышей обрабатывали в.б. дважды в неделю 0,4 мг/кг или 4 мг/кг Ab1, или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или контрольным базовым раствором.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00131] Перед описанием настоящего изобретения следует отметить, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, так как эти способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология используется в целях описания только конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничивается исключительно прилагаемой формулой изобретения.

[00132] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно подразумеваются специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В контексте данного документа термин «около», употребляемый в отношении конкретного приведенного числового значения, означает, что данное значение может варьироваться относительно приведенного значения не более чем в пределах 1 %. Например, в контексте данного документа выражение «около 100» включает 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[00133] Хотя для практической реализации и тестирования настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в данном документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

[00134] Употребляемое в данном документе выражение «CD3» относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках как часть мультимолекулярного рецептора Т-клеток (РТК) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образуемого вследствие ассоциации двух или четырех рецепторных цепей: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. Все упоминаемые в данном документе белки, полипептиды и белковые фрагменты относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если специально не указано, что они получены от отличного от человека вида. Таким образом, выражение «CD3» означает человеческий CD3, если специально не указано, что он получен от отличного от человека вида, например, «мышинный CD3», «обезьяний CD3» и т.д.

[00135] В контексте данного документа «антитело, которое связывает CD3» или «анти-CD3 антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически

распознают одну субъединицу CD3 (например, эpsilon, delta, gamma или zeta), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 gamma/epsilon, delta/epsilon и zeta/zeta). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или экспрессируемый на клеточной поверхности CD3. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также рекомбинантные варианты белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, в которых отсутствует трансмембранный домен или в которых каким-либо другим образом отсутствует связь с клеточной мембраной.

[00136] Употребляемое в данном документе выражение «экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» означает один или более белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так, что по меньшей мере часть белка CD3 представлена на внеклеточной части клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» включает белки CD3, содержащиеся в составе функционального рецептора Т-клеток в мембране клетки. Выражение «экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеров CD3 gamma/epsilon, delta/epsilon и zeta/zeta). Выражение «экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» также включает цепь CD3 (например, CD3-epsilon, CD3-delta или CD3-gamma), которая экспрессируется одна, в отсутствие других типов цепей CD3, на поверхности клетки. «Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. В альтернативном варианте «экспрессируемый на клеточной поверхности CD3» может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий CD3 на своей поверхности, но была искусственно сконструирована так, чтобы экспрессировать CD3 на своей поверхности.

[00137] Употребляемое в данном документе выражение «анти-CD3 антитело» включает моновалентные антитела с единичной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD3, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, при этом анти-CD3 плечо содержит любую или последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в данном документе в Таблице 1 или Таблице 2. Примеры анти-CD3 биспецифических антител описаны в другом месте данного документа. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

Типовые анти-CD3 антитела также описаны в US 2007/0280945A1; и в Международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[00138] Употребляемый в данном документе термин «CD20» относится к человеческому белку CD20, если специально не указано, что он получен от отличного от человека вида (например, «мышинный CD20», «обезьяний CD20» и т.д.). Человеческий белок CD20 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую стандартной последовательности NCBI NP 690605.1.

[00139] Употребляемое в данном документе выражение «анти-CD20 антитело» включает моновалентные антитела с единичной специфичностью, такие как Ритуксан (ритуксимаб), описанный в US 7879984. Типовые анти-CD20 антитела также описаны в US 7879984 и Международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

[00140] Употребляемый в данном документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, CD3). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи – две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена – C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разделенные более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах реализации изобретения FR анти-CD3 антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичными с последовательностями человеческой зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или более CDR.

[00141] Употребляемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Употребляемые в данном документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и им подобные включают любой природный, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител при помощи любых подходящих стандартных методов, таких как методы протеолитического расщепления или рекомбинантной генетической инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и химически обрабатывать при помощи методов молекулярной биологии, например, чтобы упорядочить один или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или чтобы внести кодоны, внести цистеиновые остатки, модифицировать, добавить или удалить аминокислоты и т.д.

[00142] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (SMIP) и акулы вариабельные домены IgNAR также включены в употребляемое в данном документе выражение «антигенсвязывающий фрагмент».

[00143] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и в общем случае содержит по меньшей мере одну CDR, которая прилегает или находится в рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, в которых домен V_H связан с доменом V_L, домены V_H и

V_L могут быть расположены по отношению друг к другу в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H , V_H-V_L или V_L-V_L . В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[00144] В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним доменом константного фрагмента (F_c) или каким-либо другим образом связанный с F_c -доменом. Термин «связанный с» относится к прямому соединению посредством ковалентной связи или линкерной полипептидной последовательности, результатом которого является совмещение двух компонентов, например, переменного домена, связанного с константным доменом. Таким образом, в определенных примерах переменные домены, содержащие первый и второй антигенсвязывающие домены, такие как те, что связывают CD3 и CD20 с образованием биспецифического антитела, прямым образом соединены (или связаны) посредством ковалентной связи или линкерной аминокислотной последовательности, например, с (от N-конца к C-концу) полными или частичными C_{H1} , химерным шарнирным, C_{H2} и C_{H3} доменами. Неограничивающие типовые конфигурации переменных и константных доменов, которые могут находиться в составе антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_{H1} -шарнир- C_{H2} - C_{H3} ; (ii) V_H -шарнир- C_{H2} - C_{H3} ; (iii) V_H - C_L ; (iv) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (v) V_L - C_{H2} - C_{H3} ; и (vi) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из вышеприведенных типовых конфигураций, переменные и константные домены могут быть как напрямую соединены друг с другом, или могут быть соединены (связаны) посредством полной или частичной химерной шарнирной области согласно изобретению или посредством полного или частичного C_{H1} и химерной шарнирной области. В некоторых случаях переменные и F_c -домены может соединять (связывать) полипептидный линкер (например, от 2 до 10 аминокислот) или может существовать дополнительное соединение с полной или частичной химерной шарнирной областью и/или C_{H1} . Шарнирная область может состоять по меньшей мере из верхних и нижних шарнирных аминокислот, что приводит к гибкому или полугибкому соединению между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из вышеприведенных конфигураций переменного и константного домена, находящихся в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более

мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной(ы) связи(ей)).

[00145] Мультиспецифический формат антитела согласно изобретению, включая типовые раскрытые в данном документе биспецифические форматы антител, как правило, содержит два разных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном. Мультиспецифические форматы можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению при помощи рутинных методов, доступных в данной области техники.

[00146] Антитела согласно настоящему изобретению модифицируют так, чтобы они характеризовались сниженной или отсутствующей комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ) согласно *in vitro* измерениям. «Комплемент-зависимая цитотоксичность» (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом согласно изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым приводят к лизису клетки-мишени. КЗЦ и АЗКЦ можно определить при помощи методов анализа, которые хорошо известны и доступны в данной области техники. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область тяжелой цепи (CH) антитела важна в контексте способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, CH антитела можно выбирать на основании того, является ли необходимым опосредование антителом цитотоксичности.

[00147] В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению представляют собой человеческие антитела. Употребляемый в данном документе термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, внесенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. При этом употребляемый в данном документе термин «человеческое антитело» не

включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты в человеческие каркасные последовательности.

[00148] Антитела согласно изобретению могут, в некоторых вариантах реализации изобретения, быть рекомбинантными человеческими антителами. Употребляемый в данном документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые при помощи рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицирующего клетку-хозяина (более подробно описанного ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (более подробно описанной ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенного в отношении генов человеческого иммуноглобулина (См., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. При этом в определенных вариантах реализации изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или в случае применения животного, трансгенного в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя получены из и являются родственными последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут отсутствовать в естественном репертуаре антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

[00149] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, что связано с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе посредством межцепевой дисульфидной связи тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны межцепевыми дисульфидными связями, а образуемая молекула массой около 75-80 кДа состоит из ковалентно сопряженных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Эти формы исключительно трудно делимы даже после аффинной очистки.

[00150] Частота появления второй формы в различных изотипах интактного IgG связана с,

но не ограничена, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Единичная аминокислотная замена в шарнирной области человеческого IgG4 может значительно снизить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых в случае шарнирной области человеческого IgG1. В настоящее изобретение включены антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнирной области, которые могут, например, при получении, улучшить выход необходимой формы антитела.

[00151] Антитела согласно изобретению могут быть выделенными антителами. В контексте данного документа «выделенное антитело» означает антитело, которое было выявлено и отделено и/или избавлено по меньшей мере от одного компонента своего естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено или избавлено по меньшей мере от одного компонента организма или от ткани или клетки, в которых антитело находится в естественном состоянии или вырабатывается естественным образом, является «выделенным антителом» в контексте настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения выделенное антитело может быть в значительно степени свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

[00152] Раскрытые в данном документе анти-CD3 или анти-CD20 вариабельные области могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации легко можно выявить, сравнивая раскрытые в данном документе аминокислотные последовательности с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общественных баз данных по последовательностям антител. В настоящее изобретение включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей, в которых одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR были мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий(ие) остаток(ки) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения в последовательности называются в данном документе «мутациями

зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи, легко может получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинаций. В определенных вариантах реализации изобретения все остатки каркасной области и/или CDR в пределах доменов V_H и/или V_L мутированы обратно к остаткам, находящимся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах реализации изобретения только определенные остатки мутированы обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4 находятся только мутированные остатки или в пределах CDR1, CDR2 или CDR3 находятся только мутированные остатки. В других вариантах реализации изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой оригинально было получено антитело). Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, когда определенные индивидуальные остатки мутированы на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы на соответствующий остаток отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно исследовать в отношении одного или более необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, включены в настоящее изобретение.

[00153] В настоящее изобретение также включены анти-CD3 или анти-CD20 переменные области, содержащие варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, содержащие одну или более консервативных замен. Например, в настоящее изобретение включены анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными

аминокислотными заменами по сравнению с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в данном документе в Таблице 1.

[00154] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специальным участком связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и могут иметь разное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется вследствие пространственного расположения рядом аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп на антигене может содержать компоненты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп.

[00155] Термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный», употребляемый в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере около 95 % и, более предпочтительно, по меньшей мере около 96 %, 97 %, 98 % или 99 % нуклеотидных оснований согласно определению при помощи любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную степень идентичности со стандартной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или в значительной степени сходную аминокислотную последовательность с полипептидом, кодируемым стандартной молекулой нуклеиновой кислоты.

[00156] В отношении полипептидов термин «значительная степень сходства» или «в значительной степени сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, осуществленном при помощи программ GAP или BESTFIT с весом гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95 % идентичности последовательностей, даже более предпочтительно, по меньшей мере 98 % или 99 % идентичности последовательностей. Предпочтительно, позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» – это такая замена, в которой аминокислотный остаток замещают другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу)

со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем случае консервативная аминокислотная замена существенно не меняет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства можно повышать, чтобы учесть консервативную природу замены. Способы проведения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи – цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. «Умеренно консервативным» замещением является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00157] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, как правило, определяют, используя программное обеспечение для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка проводит сопоставление сходных последовательностей, учитывая показатели сходства, приписываемые различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG включает программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с установленными по умолчанию параметрами для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версия 6.1. Сравнение полипептидных последовательностей также можно проводить при помощи FASTA с установленными по умолчанию или рекомендованными параметрами, программа FASTA в GCG версия 6.1. (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и

определение процента идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом в случае сравнения последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN с установленными по умолчанию параметрами. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы

[00158] Антитела согласно настоящему изобретению могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов на полипептиде-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связано (например, путем химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другим образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, чтобы получить биспецифическое или мультиспецифическое антитело с дополнительной специфичностью связывания.

[00159] Таким образом, в настоящее изобретение включены биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий CD3, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении антигена-мишени. Антиген-мишень, с которым связывается другое плечо CD3-биспецифического антитела, может быть любым антигеном, экспрессируемым на или вблизи клетки, ткани, органа, микроорганизма или вируса, против которых необходим направленный иммунный ответ. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в данном документе в Таблице 1.

[00160] В контексте биспецифических антител согласно настоящему изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень, антиген-мишень может представлять собой опухолеассоциированный антиген.

Неограничивающие примеры опухолеассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, BIRC5 (сурвивин), BIRC7, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, cyclin-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6- AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, антиген Томсена (Tn), TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

[00161] В контексте биспецифических антител согласно настоящему изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень, антиген-мишень может представлять собой ассоциированный с инфекционным заболеванием антиген. Неограничивающие примеры ассоциированных с инфекционным заболеванием антигенов включают, например, антиген, который экспрессируется на поверхности вирусной частицы, или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая инфицирована вирусом, при этом вирус выбран из группы, состоящей из ВИЧ, гепатита (А, В или С), вируса герпеса (например, ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВГА-6, ВЗВ, вируса Эпштейна-Барр), аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторного синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса коревой краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, ТЛВЧ, вируса денге, папилломавируса, вируса контагиозного моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингема и арбовирусного вируса энцефалита. В альтернативном варианте антиген-мишень может представлять собой антиген, который экспрессируется на поверхности бактерии, или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая инфицирована бактерией, при этом бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидии, риккетсии, микобактерии, стафилококка, стрептококка, пневмококка, менингококка, гонококка, клебсиеллы, протеуса, серратии, псевдомонады, легионеллы, дифтерии, сальмонеллы, бациллы, холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспиры и бактерий болезни Лайма. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-мишень представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности грибка, или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая инфицирована грибом, при этом грибок выбран из группы, состоящей из

Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus (fumigatus, niger* и т.д.), *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus* и т.д.), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-мишень представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности паразита, или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая инфицирована паразитом, при этом паразит выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, вида *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, вида *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps* и *Brugia malayi*. Неограничивающие примеры специфических патоген-ассоциированных антигенов включают, например, gp120 ВИЧ, CD4 ВИЧ, гликопротеин L гепатита В, гликопротеин М гепатита В, гликопротеин S гепатита В, Е1 гепатита С, Е2 гепатита С, гепатоцит-специфический белок, gB вируса простого герпеса, gB цитомегаловируса и оболочечный белок ТЛВЧ.

[00162] В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации в настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и CD20. В данном документе такие молекулы могут называться, например, «анти-CD3/анти-CD20» или «анти-CD3/CD20», или «анти-CD3xCD20», или «CD3xCD20» биспецифическими молекулами или другой сходной терминологией.

[00163] Употребляемое в данном документе выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий из по меньшей мере одной определяющей комплементарность области (CDR), которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфически связывается с конкретным антигеном. В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые определены в другом месте данного документа.

[00164] Употребляемое в данном документе выражение «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый

антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отличный антиген (например, CD20).

[00165] В определенных типовых вариантах реализации настоящего изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифического антитела), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «A1», а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «A2». Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

[00166] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или непрямо соединены друг с другом, образуя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению (т.е. биспецифический ScFv), дополнительно связанную с Fc-доменом. В альтернативном варианте первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть соединены с отдельным Fc-доменом. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат два Fc-домена, каждый из которых является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй Fc-домены могут иметь одинаковую последовательность за исключением мутации в домене C_H3, предназначенной для облегчения очистки гетеродимерных (т.е. биспецифических) молекул.

[00167] В настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, а по меньшей мере одно аминокислотное отличие снижает связывание биспецифического антитела с протеином А. В одном варианте реализации изобретения первый домен C_H3 Ig связывает протеин А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание протеина А, такую как модификация H435R (согласно нумерации EU; H95R согласно нумерации экзонов IMGT). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y436F (согласно нумерации EU; Y96F согласно IMGT). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать во втором C_H3, включают:

D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I согласно IMGT) в случае доменов C_H3 IgG1; и Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I согласно IMGT) в случае доменов C_H3 IgG4.

[00168] Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению можно использовать другие форматы или технологии биспецифических антител. Например, антитело или его фрагмент, имеющее первую антигенсвязывающую специфичность, может быть функционально связано (например, путем химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другим образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющее вторую антигенсвязывающую специфичность, чтобы получить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Конкретные типовые биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничений, например, основанные на scFv или диателах биспецифические форматы, продукты слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадруму, выступ-во-впадину, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступом-во-впадину и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновые молнии, дуотело, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (См., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и перечисленные в ней ссылки в отношении обзора вышеприведенных форматов).

[00169] В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению Fc-домены могут содержать одно или более аминокислотных изменений (например, вставок, делеций или замен) по сравнению с конкретной химерной версией Fc-домена без изменения необходимой функциональности. Например, в изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, которые приводят к получению модифицированного Fc-домена, характеризующегося модифицированным взаимодействием связывания (например, усиленным или ослабленным) между Fc и FcRn. В одном варианте реализации изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, причем модификация повышает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH соответствует диапазону от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают, например, модификацию в позиции 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T), и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например,

L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте реализации изобретения модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и а 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Варианты последовательностей

[00170] Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации легко можно выявить, сравнивая раскрытые в данном документе аминокислотные последовательности с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общественных баз данных по последовательностям антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получены из любых раскрытых в данном документе типовых аминокислотных последовательностей, в которых одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR были мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий(ие) остаток(ки) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения в последовательности называются в данном документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи, легко может получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинаций. В определенных вариантах реализации изобретения все остатки каркасной области и/или CDR в пределах доменов V_H и/или V_L мутированы обратно к остаткам, находящимся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой оригинально был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах реализации

изобретения только определенные остатки мутированы обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4 находятся только мутированные остатки или в пределах CDR1, CDR2 или CDR3 находятся только мутированные остатки. В других вариантах реализации изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой оригинально был получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, когда определенные индивидуальные остатки мутированы на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы на соответствующий остаток отличной последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно исследовать в отношении одного или более необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженная иммуногенность и т.д. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, включены в настоящее изобретение.

[00171] В настоящее изобретение также включены антигенсвязывающие молекулы, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, содержащие одну или более консервативных замен. Например, в настоящее изобретение включены антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR. «Консервативная аминокислотная замена» – это такая замена, в которой аминокислотный остаток замещают другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В

общем случае консервативная аминокислотная замена существенно не меняет функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи – цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативным» замещением является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00172] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, можно определить, используя программное обеспечение для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка проводит сопоставление сходных последовательностей, учитывая показатели сходства, приписываемые различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG включает программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с установленными по умолчанию параметрами для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версия 6.1. Сравнение полипептидных последовательностей также можно проводить при помощи FASTA с установленными по умолчанию или рекомендованными параметрами, программа FASTA в GCG версия 6.1. (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение процента идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом в случае сравнения последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN с установленными по умолчанию параметрами. См.,

например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

pH-зависимое связывание

[00173] В настоящее изобретение включены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, анти-CD3 антитело согласно настоящему изобретению может демонстрировать сниженное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В альтернативном варианте анти-CD3 антитела согласно изобретению могут демонстрировать повышенное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает величины pH ниже 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Употребляемое в данном документе выражение «нейтральный pH» означает pH от около 7,0 до около 7,4. Выражение «нейтральный pH» включает величины pH около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[00174] В определенных случаях «сниженное связывание ... при кислом pH по сравнению с нейтральным pH» выражают в терминах соотношения величины K_d связывания антитела с его антигеном при кислом pH и величины K_d связывания антитела с его антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, в контексте настоящего изобретения может считаться, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет «сниженное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH», если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует соотношение кислой/нейтральной K_d , составляющее около 3,0 или более. В определенных типовых вариантах реализации изобретения соотношение кислой/нейтральной K_d для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

[00175] Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получить, например, проводя скрининг популяции антител в отношении сниженного (или повышенного) связывания с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут привести к получению антител с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замещения одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело со сниженным связыванием антигена при кислом pH по сравнению с

нейтральным pH.

Связывание Fc-рецептора

[00176] Предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению, содержащие химерный Fc-домен, такой как шарнир-CH2-CH3 константный домен тяжелой цепи Ig, полученный из IgG разных изотипов и имеющий уникальные характеристики в отношении связывания и активации Fc-рецептора. Некоторые Fc-домены согласно изобретению сконструированы так, чтобы содержать химерную шарнирную область.

[00177] Употребляемый в данном документе термин «химерный» означает «созданный из частей разного происхождения». Выражение «химерный белок» включает первый аминокислотный белок, связанный со вторым аминокислотным белком, с которым он обычно не связан в природе. Аминокислотные последовательности, которые в обычном состоянии могут существовать в виде отдельных белков или находиться в другом расположении в одном белке, соединяют в слитом белке в новом расположении. Химерные белки можно создавать различными известными в данной области техники способами, например, путем химического синтеза или путем создания полинуклеотида, который кодирует аминокислоты химерного белка в необходимом расположении. Типовые химерные белки включают химерные шарнирные последовательности, соединяющие домены тяжелой цепи IgG, и слитые белки, сконструированные для получения человеческих антител и антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению.

[00178] Раскрытые в данном документе химерные белки были сконструированы так, чтобы минимизировать создание иммуногенных эпитопов в соединениях, например, по сравнению с Fc-областью или Fc-доменом IgG дикого типа. Следовательно, сконструированные белки согласно изобретению имеют сниженную иммуногенность и демонстрируют сниженное связывание с Fc-рецепторами, а также сниженные или отсутствующие эффекторные функции.

[00179] Употребляемый в данном документе термин «шарнирная область» включает область идущих подряд аминокислотных остатков, которые соединяют C-конец C_H1 с N-концом домена C_H2 иммуноглобулина. Несколько аминокислот N-конца домена C_H2, которые кодируются экзоном C_H2, также считаются частью «нижней шарнирной области». Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, можно сказать, что аминокислоты шарнирной области IgG1, IgG2 и IgG4 содержат 12-15 идущих подряд аминокислот, кодируемых отличным шарнирным экзоном, и несколько N-концевых аминокислот

домена C_H2 (кодируемых экзоном C_H2) (Brekke, O.H., et al. *Immunology Today* 16(2):85-90 (1995)). С другой стороны, IgG3 содержит шарнирную область, состоящую из четырех сегментов: одного верхнего сегмента, напоминающего шарнирную область IgG1, и 3 сегментов, которые представляют собой идентичные аминокислотные повторы, присущие IgG3.

[00180] Употребляемый в данном документе термин «химерная шарнирная область» включает химерный белок, содержащий первую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области одной молекулы Ig, и вторую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области молекулы Ig другого класса или подкласса. Типовые химерные области согласно настоящему изобретению содержат первую аминокислотную последовательность или «верхнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области человеческого IgG1 или шарнирной области человеческого IgG4, и вторую аминокислотную последовательность или «нижнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области человеческого IgG2. В определенных вариантах реализации изобретения первая или «верхняя шарнирная» последовательность содержит аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая или «нижняя шарнирная» последовательность содержит аминокислотные остатки от позиции 228 до 236 согласно нумерации EU.

[00181] В контексте данного описания подразумевается, что «верхняя шарнирная область» включает аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 согласно нумерации EU (аминокислотные остатки от позиции 226 до 240 согласно нумерации Кабата) (См. Фигуру 1). Подразумевается, что «нижняя шарнирная область» включает аминокислотные остатки от позиции 228 до 236 согласно нумерации EU (аминокислотные остатки от позиции 241 до 249 согласно нумерации Кабата) (См. Фигуру 1).

[00182] В тексте настоящем описании в целях удобства для того, кто осуществляет практическую реализацию изобретения, аминокислоты шарнирной области человеческого IgG1, IgG2 и IgG4 были определены согласно нумерации EU по Кабату (Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)), также известной как «нумерация EU» или «индекс EU», дополненной в соответствии с IMGT® Scientific Chart, IMGT®, международной информационной системой ImMunoGeneTics®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, файл создан: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.

[00183] Соответствие между нумерацией EU аминокислот шарнирной области

человеческого IgG1, IgG2 и IgG4 и системами уникальной нумерации доменов по IMGT, нумерации экзонов по IMGT и нумерации Кабата (См. также Kabat, E.A. et al., 1991, *выше*) описано ниже в Таблицах от А до F:

[00184] Таблица А: Нумерация для шарнирной области IgG1

Аминокислоты IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Уникальная нумерация IMGT для шарнирной области ^а	Нумерация экзонов IMGT ^а	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
P	2	2	217	227
K	3	3	218	228
S	4	4	219	232 ^а [229] ^б
C	5	5	220	233 ^а [230] ^б
D	6	6	221	234 ^а [232] ^б
K	7	7	222	235
T	8	8	223	236
H	9	9	224	237
T	10	10	225	238
C	11	11	226	239
P	12	12	227	240
P	13	13	228	241
C	14	14	229	242
P	15	15	230	243

[00185] Таблица В: Нумерация С-доменов для шарнирной области IgG1

Аминокислоты IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Уникальная нумерация IMGT для С-доменов ^а	Нумерация экзонов IMGT ^а	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	1,6	1	231	244
P	1,5	2	232	245
E	1,4	3	233	246
L	1,3	4	234	247
L	1,2	5	235	248
G	1,1	6	236	249

[00186] Таблица С: Нумерация для шарнирной области IgG2

Аминокислоты IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Уникальная нумерация IMGT для шарнирной области ^а	Нумерация экзонов IMGT ^а	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
R	2	2	217	227
K	3	3	218	228
C	4	4	219 ^а (221) ^б	232

C	5	5	220 ^a (-) ^b	233
V	6	6	222	235
E	7	7	224	237
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
P	10	10	228	241
c	11	11	229	242
p	12	12	230	243

[00187] Таблица D: Нумерация C-доменов для шарнирной области IgG2

Аминокислоты IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	231	244
P	232	245
P	233	246
V	234	247
A	235	248
--	236	249

[00188] Таблица E: Нумерация для шарнирной области IgG4

Аминокислоты IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Уникальная нумерация IMGT для шарнирной области ^a	Нумерация экзонов IMGT ^a	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
S	2	2	217	227
K	3	3	218	228
Y	4	4	- ^a (219) ^b	229
G	5	5	- ^a (220) ^b	230
P	6	6	224	237
P	7	7	225	238
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
S	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

[00189] Таблица F: Нумерация C-доменов для шарнирной области IgG4

Аминокислоты IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
F	234	247
L	235	248

G	236	249
---	-----	-----

Аминокислоты, являющиеся результатом сплайсинга экзонов, приведены в скобках.

- означает отсутствие соответствующего номера

-- означает отсутствие соответствующей аминокислоты в этой позиции

^a нумерация в соответствии с последним обновлением IMGT Scientific Chart

^b нумерация в соответствии с индексом EU, опубликованная в Kabat, EA, et al. 1991

Также См., например, Lefranc, M.-P. et al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); и Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63:78-85 (1969).

[00190] Термин «связывание» в контексте связывания антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с любым из, например, заданного антигена или FcγR, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации минимум между двумя компонентами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген или Fc-содержащего белка с FcγR.

[00191] Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_d около 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее, определенному, например, методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при помощи инструмента BIAcore 3000 с применением в качестве лиганда антигена или FcR и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антилиганда). Соответственно, антитело или другой связывающий белок связывается с заданным антигеном или рецептором с аффинностью, соответствующей значению K_d , по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его аффинность в отношении связывания неспецифического антигена (например, БСА, казеина).

[00192] Употребляемый в данном документе термин « K_d » (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе диссоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Существует обратная взаимосвязь между K_d и аффинностью связывания, следовательно, чем меньше значение K_d , тем выше, т.е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к большей способности к взаимодействию и, следовательно, меньшему значению K_d , и наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к меньшей способности к взаимодействию и, следовательно, большему значению K_d . В некоторых обстоятельствах более высокую аффинность связывания (или K_d) конкретной молекулы (например, антитела) со своей молекулой-партнером (например, рецептором X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы

(например, антитела) с другой молекулой-партнером (например, рецептором Y) можно выразить в виде соотношения связывания, разделив большее значение K_d (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее значение K_d (более высокая или более сильная аффинность), например, в зависимости от ситуации, выразив как 5-кратно или 10-кратно превышающую аффинность связывания.

[00193] Употребляемый в данном документе термин « k_d » (s^{-1} или $1/s$) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости диссоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Указанную величину также называют величиной $k_{дисс}$.

[00194] Употребляемый в данном документе термин « $k_{асс}$ » ($M^{-1} \times s^{-1}$ или $1/M$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR.

[00195] Употребляемый в данном документе термин « K_A » (M^{-1} или $1/M$) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе ассоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Равновесную константу ассоциации определяют путем деления $k_{асс}$ на $k_{дисс}$.

[00196] Употребляемый в данном документе термин «EC50» или «EC₅₀» относится к полумаксимальной эффективной концентрации, что означает концентрацию антитела, которая индуцирует ответ, соответствующий середине между исходным и максимальным уровнем при указанном времени воздействия. Фактически EC₅₀ представляет концентрацию антитела, при которой наблюдается 50 % от его максимального действия. Таким образом, снижение связывания наблюдается при повышении значения EC₅₀ или полумаксимальной эффективной концентрации.

[00197] В одном варианте реализации изобретения снижение связывания можно определить как повышение EC₅₀ для концентрации антитела, которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

[00198] В некоторых вариантах реализации изобретения снижение цитотоксической активности, такой как АЗКЦ или КЗЦ, можно определить как повышение EC₅₀ для концентрации антитела, которая обеспечивает лизис полумаксимального количества клеток-мишеней. Цитотоксичность также определяют в виде процента цитотоксичности или процента лизиса, что соответствует лизированной части популяции клеток по данным анализа высвобождения кальцеина или эквивалентного анализа. Процент цитотоксичность можно определять так, как описано в Примере 6.

[00199] В других вариантах реализации изобретения снижение пролиферации можно определить как повышение EC_{50} для концентрации антитела, которая обеспечивает пролиферацию полумаксимального количества клеток-мишеней.

[00200] Употребляемое в данном документе выражение «эффекторные функции» включает функциональную способность, обеспечиваемую Fc-содержащим белком, в отношении связывания с FcγR. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, можно сказать, что образование комплекса Fc/FcγR привлекает разнообразные эффе́кторные клетки к месту связывания антигена, что, как правило, приводит к запуску разнообразных сигнальных каскадов в клетках и важным последующим иммунным ответам.

[00201] Химерные Fc-содержащие антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению демонстрируют измененные или сниженные эффе́кторные функции по сравнению с соответствующими Fc-содержащими антигенсвязывающими белками или антителами дикого типа. См., например, публикацию согласно РСТ № WO 2014/121087, опубликованную 07 августа 2014 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[00202] В некоторых вариантах реализации изобретения эффе́кторная функция, которая была снижена или изменена, является цитотоксической эффе́кторной функцией, например, цитотоксичностью, комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ) или антителозависимой цитотоксичностью (АЗКЦ). В одном варианте реализации настоящего изобретения эффе́кторная функция, которая была снижена или изменена, является комплемент-зависимой цитотоксичностью. В другом варианте реализации изобретения эффе́кторная функция, которая была снижена или изменена, является антителозависимой цитотоксичностью. В других вариантах реализации изобретения эффе́кторная функция, которая была снижена или изменена, представляет собой клеточную пролиферацию клеток-мишеней.

[00203] Некоторые эффе́кторные функции антител опосредуются, по меньшей мере частично, Fc-рецепторами (FcR), которые связывают Fc-область антитела в константном домене (в частности, домене CH2 и CH3) типового иммуноглобулина. Существует большое количество Fc-рецепторов специфических в отношении разных классов иммуноглобулинов, т.е. IgG, IgE, IgA, IgM и IgD. Семейство Fc-рецепторов человеческого IgG делится на три группы: FcγRI (CD64), который способен связывать IgG с высокой аффинностью, FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), которые оба являются низкоаффинными рецепторами. Каждый подкласс FcγR кодируется двумя или тремя генами, а альтернативный РНК-сплайсинг приводит к получению множества транскриптов, следовательно, существует большое разнообразие изоформ FcγR (например, FcγRIA

(CD64; FCGR1A), FcγRIB (CD64; FCRG1B), FcγRIIA (CD32A; FCGR2A), FcγRIIB (CD32B; FCGR2B), FcγRIIC (CD32C; FCGR2C), FcγRIIA (CD16a; FCGR3A) и FcγRB (CD16b; FCGR3B)). Кроме того, FcRn или неонатальный Fc-рецептор (также известный как Fc-рецептор-переносчик, альфа или FCGRT) способен переносить антитела IgG из материнского организма в плод через плаценту. Кроме того, Fc-рецепторы экспрессируются на множестве клеток, включая, например, В-клетки, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и некоторые лимфоциты. Например, клетки U937 человеческой клеточной линии моноцитов экспрессируют как FcγRI, так и FcγRIIA (См., например, Jones, et al. *J Immunol* 135(5):3348-53 (1985); и Brooks, et al. *J Exp Med* 170:1369-85 (October 1989)). Каждый упоминаемый в данном документе рецептор включают любую известную функциональную форму рецептора, включая транскрипционные варианты, изоформы и полиморфизмы.

[00204] Связывание Fc Ig со своим рецептором привлекает эти эффекторные клетки к участку связывания антигена, что в конечном итоге приводит к запуску множества сигнальных и иммунных ответов, включая активацию В-клеток, воспалительные ответы, цитотоксические ответы и фагоцитарные ответы. Следовательно, снижение или изменение связывания Fc Ig со своим рецептором может привести к снижению эффекторных функций.

[00205] Выражение «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или «АЗКФ» относится к эффекторной функции, результатом которой является устранение (или уничтожение) клетки-мишени путем поглощения клетки-мишени, а не индукции цитолиза. АЗКФ может быть важным *in vivo* механизмом для уничтожения опухолевых клеток. АЗКФ можно определять при помощи двухцветового флуоресцентного анализа методом проточной цитометрии, например, с использованием RKN2 (зеленого флуоресцентного красителя) и фикоэритрин-конъюгированных (красных) моноклональных антител против разных белков клеточной поверхности для дифференцирования исследуемых клеток, определяя таким образом фагоцитарную активность и скорость фагоцитоза. Определение АЗКФ хорошо известно в данной области техники. Терапевтические стратегии, в которых избирательно активируется FcγRIIA по сравнению с FcγRIIB, могут повысить фагоцитарную активность макрофагов (Richards, JO, et al. 2008 *Mol Cancer Ther* 7(8):2517-27). Химерные Fc-содержащие антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению связывают и активируют человеческий FcγRIIA. В определенных обстоятельствах антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению связывают человеческий FcγRIIA с более высокой аффинностью связывания, чем они связывают FcγRIIB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует

аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA, более чем в около 5 раз превышающую его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIB, при этом значения аффинности связывания выражены через K_d . В других вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA более чем в около 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз превышающую его аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIB.

Биологические хаактеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул

[00206] В настоящее изобретение включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 и CD20. Например, в настоящее изобретение включены анти-CD3хCD20 антитела, которые связывают клетки Jurkat (CD3+) и клетки Raji (CD20+) со значением EC_{50} , составляющим менее чем около 60 нМ, согласно данным *in vitro* анализа связывания, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 3 (например, оценивая связывание клеток Jurkat или клеток Raji с CD3хCD20 антителами), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD3 или CD20 на поверхности клетки (например, клетки Jurkat и/или клетки Raji) со значением EC_{50} , составляющим менее чем около 75 нМ, менее чем около 70 нМ, менее чем около 65 нМ, менее чем около 60 нМ, менее чем около 50 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 30 нМ или менее чем около 25 нМ, согласно данным *in vitro* анализа связывания, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 4, или в значительной степени сходного анализа.

[00207] В настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с человеческим CD3 и человеческим CD20. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению специфически взаимодействуют с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или CD20. Степень, в которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD3 и/или CD20, можно оценить методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), как проиллюстрировано в Примере 4. Например, в настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают человеческие Т-клеточные линии, которые экспрессируют CD3 (например, Jurkat), связывают человеческие В-клеточные линии, которые экспрессируют CD20

(например, Raji), и Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови [МКПК] яванских макаков). В настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любую из вышеприведенных клеток со значением EC_{50} , составляющим от около $8,74 \times 10^{-6}$ до около $5,99 \times 10^{-8}$ или менее, согласно данным анализа FACS, как показано в Примере 4, или в значительной степени сходного анализа.

[00208] В настоящее изобретение также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 и индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. Например, в настоящее изобретение включены анти-CD3хCD20 антитела, которые индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток со значением EC_{50} , составляющим менее чем около 60 нМ, согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 5 (например, оценивая степень уничтожения опухолевых клеток Raji человеческими МКПК в присутствии анти-CD3 антител), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (например, опосредованное МКПК уничтожение клеток Raji) со значением EC_{50} , составляющим менее чем около 56 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 45 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 35 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 25 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 15 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 5 пМ или менее чем около 1 пМ, согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 5, или в значительной степени сходного анализа.

[00209] В настоящее изобретение также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3/CD20 и индуцируют комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), хотя в меньшей степени, чем антитела, имеющие Fc-домен IgG дикого типа. Например, в настоящее изобретение включены анти-CD3хCD20 антитела, которые индуцируют КЗЦ-уничтожение клеток Raji или Daudi (CD20-экспрессирующих), при этом процент цитотоксичности (% цитотоксичности или % клеточного лизиса) составляет менее чем около 50 % согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 6 (например, оценивая степень уничтожения клеток-мишеней (Raji или Daudi) в присутствии комплемента и анти-

CD3xCD20 антител), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют уничтожение клеток посредством КЗЦ (например, комплемент-опосредованное уничтожение клеток Raji или Daudi), при этом процент цитотоксичности составляет менее чем около 45 %, менее чем около 40 %, менее чем около 35 %, менее чем около 30 %, менее чем около 25 %, менее чем около 20 %, менее чем около 15 %, менее чем около 10 %, менее чем около 5 %, менее чем около 1 %, менее чем фоновая цитотоксичность или выявляемая цитотоксичность отсутствует согласно данным *in vitro* анализа комплемент-опосредованного уничтожения клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 6, или в значительной степени сходного анализа.

[00210] В настоящее изобретение также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3/CD20 и существенно не индуцируют антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) по сравнению с антителами, имеющими Fc-домен IgG дикого типа. Например, в настоящее изобретение включены анти-CD3xCD20 антитела, характеризующиеся отсутствием значительного уничтожения клеток Raji или Daudi (CD20-экспрессирующих), при этом процент цитотоксичности (% цитотоксичности или % клеточного лизиса) составляет менее чем около 20 % (или ниже фоновой цитотоксичности) согласно данным *in vitro* анализа опосредованного NK-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 7 (например, оценивая степень уничтожения клеток-мишеней (Raji или Daudi) в присутствии NK-клеток и анти-CD3xCD20 антител), или в значительной степени сходного анализа. В значительной степени сходные методы анализа могут включать присутствие NK-клеток, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов или других FcγRIII-экспрессирующих клеток, включая клетки, экспрессирующие вариантный FcγRIII. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению демонстрируют отсутствие выявляемой АЗКЦ-активности (например, опосредованного NK-клетками FcγRIII уничтожения клеток Raji или Daudi), при этом процент цитотоксичности составляет менее чем около 30 %, менее чем около 25 %, менее чем около 20 %, менее чем около 15 %, менее чем около 10 %, менее чем около 5 %, менее чем около 1 %, менее чем фоновая цитотоксичность или выявляемая цитотоксичность отсутствует согласно данным *in vitro* анализа FcγRIII-опосредованного уничтожения клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 7, или в значительной степени сходного анализа.

[00211] В соответствии с определенными вариантами реализации в настоящее изобретение включены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий Fc γ RIIA (например, при 25⁰C) с K_d, составляющей менее чем около 23,5 мкМ, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают Fc γ RIIA с K_d, составляющей менее чем около 20,5 мкМ, менее чем около 20 мкМ, менее чем около 19,3 мкМ, менее чем около 18 мкМ, менее чем около 17 мкМ, менее чем около 16 мкМ, менее чем около 15 мкМ, менее чем около 10 мкМ, менее чем около 9 мкМ, менее чем около 8 мкМ, менее чем около 7 мкМ, менее чем около 6 мкМ, менее чем около 5 мкМ, менее чем около 4 мкМ, менее чем около 3 мкМ, менее чем около 2 мкМ, менее чем около 1 мкМ, менее чем около 900 нМ, менее чем около 800 нМ или менее чем около 700 нМ, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

[00212] В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения в настоящее изобретение включены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий Fc γ RIIB (например, при 25⁰C) с K_d, составляющей менее чем около 233 пМ, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают Fc γ RIIB с K_d, составляющей менее чем около 200 мкМ, менее чем около 190 мкМ, менее чем около 180 мкМ, менее чем около 170 мкМ, менее чем около 160 мкМ, менее чем около 150 мкМ, менее чем около 140 мкМ, менее чем около 130 мкМ, менее чем около 125 мкМ, менее чем около 123 мкМ, менее чем около 120 мкМ, менее чем около 110 мкМ, менее чем около 100 мкМ, менее чем около 90 мкМ, менее чем около 80 мкМ, менее чем около 70 мкМ, менее чем около 60 мкМ, менее чем около 50 мкМ или менее чем около 40 мкМ, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

[00213] В настоящее изобретение также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3хCD20 с диссоциативным временем полужизни (t_{1/2}), составляющим более чем около 8 дней, согласно данным поверхностного плазмонного

резонанса при 25⁰С или 37⁰С, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 9, или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела демонстрируют значение $t_{1/2}$, составляющее более чем около 5 дней, более чем около 6 дней, более чем около 7 дней, более чем около 8 дней, более чем около 9 дней, более чем около 10 дней, более чем около 11 дней, более чем около 12 дней, более чем около 13 дней, более чем около 14 дней, более чем около 15 дней или более чем около 20 дней, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса при 25⁰С или 37⁰С, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 9 (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

[00214] В настоящее изобретение также включены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые не демонстрируют значительную активность в одном или более анализах, выбранную из группы, состоящей из: (a) индуцирования пролиферации МКПК *in vitro*; (b) КЗЦ-цитотоксичности (См., например, Пример 6); (d) АЗКЦ (См., например, Пример 7).

[00215] В настоящее изобретение также включены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые демонстрируют значительную активность в одном или более анализах, выбранную из группы, состоящей из: (a) снижения числа В-клеток (например, В-клеток CD45⁺/CD20⁺) у яванских макаков (См., например, Примеры 10 и 11); (b) уменьшения объема В-клеточной опухоли (например, объема опухоли Raji) в иммунодефицитных мышинных моделях (См., например, Пример 12A); и (c) регрессии опухолей в мышинных моделях с развившимися опухолями (См., например, Пример 12B).

[00216] В настоящее изобретение включены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые способны снижать число В-клеток у субъекта (См., например, Пример 10). Например, в соответствии с определенными вариантами реализации изобретения предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем одно введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе, составляющей около 1 мг/кг, около 0,9 мг/кг, около 0,8 мг/кг, около 0,7 мг/кг, около 0,6 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 0,4 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 0,2 мг/кг, около 0,1 мг/кг, около 0,08 мг/кг, около 0,06 мг/кг, около 0,04 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,02 мг/кг, около 0,01 мг/кг или менее) приводит к снижению числа В-клеток у субъекта (например, в образце крови, взятом у субъекта) до уровня ниже выявляемого. В определенных вариантах реализации изобретения одно введение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе,

составляющей около 0,1 мг/кг, приводит к снижению числа В-клеток у субъекта до уровня ниже выявляемого приблизительно на 7 день, приблизительно на 6 день, приблизительно на 5 день, приблизительно на 4 день, приблизительно на 3 день, приблизительно на 2 день или приблизительно на 1 день после введения субъекту биспецифической антигенсвязывающей молекулы. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения одно введение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению в дозе, составляющей около 0,01 мг/кг, приводит к тому, что число В-клеток остается ниже выявляемого уровня по меньшей мере в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней или более после введения. Употребляемое в данном документе выражение «ниже выявляемого уровня» означает, что в образце крови, полученном от субъекта, невозможно прямым или непрямым образом выявить наличие В-клеток при помощи стандартных методов выявления В-клеток, например, анализа FACS для маркеров В-клеток, описанного в Примере 10.

[00217] Также в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые при введении субъекту приводят только к временному снижению числа Т-клеток. Например, предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые при введении субъекту в дозе, составляющей около 0,01 мг/кг или около 0,1 мг/кг, или около 1 мг/кг, приводят к уменьшению числа Т-клеток на 1 день после введения, но при этом число Т-клеток на микролитр крови восстанавливается в последующие временные точки (например, приблизительно на 2 день, 4 день, 7 день, 14 день, 28 день или позже после введения). Например, в настоящем изобретении предложена анти-CD3/анти-CD20 биспецифическая антигенсвязывающая молекула, при этом число Т-клеток на микролитр крови, взятой у субъекта приблизительно на 4-7 день после введения субъекту антигенсвязывающей молекулы в дозе, составляющей около 0,01 мг/кг или около 0,1 мг/кг, или около 1 мг/кг, равно или превышает число Т-клеток на микролитр крови, взятой у субъекта до введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы, согласно данным стандартного метода выявления Т-клеток, например, анализа FACS для маркеров Т-клеток, описанного в Примере 10.

Картирование эпитопов и связанные технологии

[00218] Эпитоп на CD3 или на CD20, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD3. В альтернативном варианте эпитоп может состоять из нескольких несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или CD20. Антитела согласно изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или более разных цепях CD3. Употребляемый в данном документе термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специальным участком связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и могут иметь разное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется вследствие пространственного расположения рядом аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп на антигене может содержать компоненты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп.

[00219] Для определения того, «взаимодействует» ли антигенсвязывающий домен антитела «с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке, можно использовать различные методы, известные специалистам в данной области техники. Типовые методы включают, например, стандартный анализ с перекрестным блокированием, такой как описан в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ с применением аланин-сканирующего мутагенеза, блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно применять такие методы, как исключение эпитопа, удаление эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для определения аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водородно-дейтериевый обмен, регистрируемый методом масс-спектрометрии. В общих словах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. После этого комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы сделать возможным водородно-дейтериевый обмен во всех остатках за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазами и анализу методом масс-спектрометрии, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют

конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehrling (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73\256A-265A. Также в целях картирования эпитопов можно использовать рентгеновскую кристаллографию комплекса антиген/антитело.

[00220] В настоящее изобретение дополнительно включены анти-CD3 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных типовых антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в Таблице 1). Аналогично, в настоящее изобретение также включены анти-CD3 антитела, которые конкурируют за связывание с CD3 с любым из конкретных типовых антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в Таблице 1).

[00221] В настоящее изобретение также включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, при этом первый антигенсвязывающий домен связывает тот же эпитоп на CD3, что и конкретные типовые CD3-специфические антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе, и/или второй антигенсвязывающий домен связывает тот же эпитоп на CD20, что и конкретные типовые CD20-специфические антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе.

[00222] Аналогично, в настоящее изобретение также включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, при этом первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных типовых CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD20 с любым из конкретных типовых CD20-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

[00223] В одном аспекте настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, в котором первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с человеческим CD3 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), при этом (i) A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 12; (ii) A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (iii) A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; (iv) A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (v) A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и (vi) A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который конкурирует за связывание с человеческим CD3 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит (i) аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 10, и (ii) аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 18.

[00224] В другом аспекте настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, в котором второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с человеческим CD20 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), при этом (i) A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (iii) A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (iv) A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (v) A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и (vi) A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях биспецифическое антитело содержит второй антигенсвязывающий домен, который конкурирует за связывание с человеческим CD20 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит (i) вариательную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (ii) вариательную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00225] В другом аспекте настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который конкурирует за связывание с человеческим CD3 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит (i) вариательную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (ii) вариательную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и содержащее второй антигенсвязывающий домен, который конкурирует за связывание с человеческим CD20 со стандартным антигенсвязывающим белком, который содержит (iii) вариательную область

тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00226] Специалист может легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом или конкурирует ли за его связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, используя известные в данной области рутинные методы. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом на CD3 (или CD20), что и стандартная биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, сначала позволяют стандартной биспецифической молекуле связаться с белком CD3 (или белком CD20). После этого оценивают способность исследуемого антитела связывать молекулу CD3 (или CD20). Если исследуемое антитело способно связываться с CD3 (или CD20) после насыщения связывания стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом CD3 (или CD20), чем стандартная биспецифическая антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой CD3 (или CD20) после насыщения связывания стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD3 (или CD20), что и эпитоп, связываемый стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой согласно изобретению. Для подтверждения того, что причиной наблюдаемого отсутствия связывания исследуемого антитела в действительности является связывание с тем же эпитопом, что и в случае стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, а стерическое блокирование (или другое явление) не отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания, можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, по пептидной мутации или анализу связывания). Эксперименты такого типа можно проводить при помощи ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50 %, но предпочтительно на 75 %, 90 % или даже 99 % согласно данным конкурентного анализа связывания (См., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990;50:1495-1502). В

альтернативном варианте считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, снижают или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только часть аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, снижают или устраняют связывание другого.

[00227] Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой, вышеописанный анализ связывания проводят в двух ориентациях: в первой ориентации стандартной антигенсвязывающей молекуле позволяют связаться с белком CD3 (или белком CD20) в насыщающих условиях с последующим анализом связывания исследуемого антитела с молекулой CD3 (или CD20). Во второй ориентации исследуемому антителу позволяют связаться с молекулой CD3 (или CD20) в насыщающих условиях с последующим анализом связывания стандартной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD3 (или CD20). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD3 (или CD20), можно сделать вывод, что исследуемое антитело и стандартная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD3 (или CD20). Для специалиста в данной области техники понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой, не обязательно может связывать тот же эпитоп, что и стандартное антитело, но может стерически блокировать связывание стандартного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул

[00228] Антигенсвязывающие домены, специфические в отношении конкретных антигенов, можно получать при помощи любого известного в данной области техники метода генерации антител. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфических в отношении двух разных антигенов (например, CD3 и CD20), можно надлежащим образом размещать относительно друг друга при помощи рутинных методов, чтобы получить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению. (Обсуждение типовых форматов биспецифических антител, которые можно применять для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, приведено в другом месте данного документа). В

определенных вариантах реализации изобретения один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы создания таких антител также хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более из тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению можно получить при помощи технологии VELOCIMMUNE™. При помощи технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии генерации человеческих антител) изначально выделяют высокоаффинные в отношении конкретного антигена (например, CD3 или CD20) химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Проводят характеристику и отбор антител в отношении необходимых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области замещают необходимой человеческой константной областью, чтобы получить полностью человеческие тяжелые и/или легкие цепи, которые могут быть включены в состав биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению.

[00229] Для получения человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул можно использовать генетически сконструированных животных. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна перестраивать и экспрессировать эндогенную мышиную переменную последовательность легкой цепи иммуноглобулина, при этом мышь экспрессирует только один или два человеческих переменных домена легкой цепи, кодируемых человеческими последовательностями иммуноглобулина, функционально связанными с мышиным константным геном каппа в эндогенном мышинном локусе каппа. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит переменный домен, полученный из одного или двух генных сегментов переменной области человеческой легкой цепи. (См., например, US 2011/0195454 в отношении обсуждения таких сконструированных мышей и их применения для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул).

Биоэквиваленты

[00230] В настоящее изобретение включены антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей раскрытых в данном документе типовых молекул, но сохраняют способность связывать

CD3 и/или CD20. Такие вариантные молекулы могут содержать одну или более аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с родительской последовательностью, но демонстрировать биологическую активность, в значительной степени эквивалентную активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

[00231] В настоящее изобретение включены антигенсвязывающие молекулы, биоэквивалентные любой из типовых антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если они, например, являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативными вариантами, чья скорость и степень абсорбции не демонстрирует существенную разницу при введении в одинаковых молярных дозах в сходных экспериментальных условиях, вне зависимости от того, является ли доза одноразовой или многократной. Некоторые антигенсвязывающие белки считаются эквивалентами или фармацевтическими альтернативными вариантами, если они эквивалентны в отношении степени абсорбции, но не скорости абсорбции, и могут считаться биоэквивалентными, так как подобная разница в скорости абсорбции является умышленной и отображается при маркировке, при этом она не является существенной для достижения эффективной концентрации в организме, например, при постоянном применении, и считается несущественной с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[00232] В одном варианте реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимой разницы в их безопасности, степени очистки и эффективности.

[00233] В одном варианте реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между стандартным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска возникновения побочных эффектов, включая клинически существенное изменение в иммуногенности, или снижения эффективности по сравнению с непрерывной терапией без подобного переключения.

[00234] В одном варианте реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба имеют общий механизм или механизмы действия в отношении заданного патологического состояния или состояний, в той степени, в который такие механизмы известны.

[00235] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и *in vitro* способами. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo* исследование на людях

или других млекопитающих, в котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) *in vitro* исследование, которое было скоррелировано с и является достаточно прогностическим в отношении данных по *in vivo* биодоступности для человека; (c) *in vivo* исследование на людях или других млекопитающих, в котором измеряют соответствующее острое фармакологическое действие антитела (или его мишени) как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

[00236] Биоэквивалентные варианты типовых биспецифических антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе, можно сконструировать, например, посредством проведения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, необязательных для биологической активности. Например, можно удалять или замещать другими аминокислотами остатки цистеина, не существенные для биологической активности, чтобы предотвратить образование ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков после ренатурации. В другом случае биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты типовых биспецифических антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые приводят к устранению или прекращению гликозилирования.

Видовая избирательность и видовая перекрестная реактивность

[00237] В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3, но не с CD3 других видов. Также предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD20, но не с CD20 других видов. В настоящее изобретение также включены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3 и с CD3 одного или более отличных от человека видов; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD20 и с CD20 одного или более отличных от человека видов.

[00238] В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3 и/или человеческим CD20 и могут связываться или не связываться, в зависимости от

ситуации, с CD3 и/или CD20 одного или более животных из мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макака-резуса или шимпанзе. Например, в конкретном типовом варианте реализации настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20.

Иммуноконъюгаты

[00239] В настоящее изобретение включены антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим соединением («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин, химиотерапевтический препарат, иммуносупрессор или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, который наносит вред клетке. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для получения иммуноконъюгатов известны в данной области техники (См., например, WO 05/103081).

Составление и введение терапевтических препаратов

[00240] Употребляемые в данном документе термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству активного терапевтического агента, достаточному, чтобы вызвать необходимый терапевтический ответ без нежелательных вредных побочных эффектов, таких как токсичность, раздражение или аллергические реакции. Конкретное «эффективное количество», очевидно, будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное патологическое состояние, лечение которого проводят, физическое состояние пациента, тип животного, лечение которого проводят, продолжительность лечения, природа параллельной терапии (в случае наличия) и конкретные применяемые препараты, а также структура соединений или их производных. В этом случае количество будет считаться терапевтически эффективным, если оно приводит к одному или более, без ограничений, следующим последствиям: (a) ингибированию роста опухоли (например, В-клеточного рака); и (b) обращению или стабилизации В-клеточного рака.

[00241] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, условий, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению применяют в терапевтических целях в отношении взрослого пациента, может иметь преимущество

внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, в виде одной дозы, составляющей от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести патологического состояния можно корректировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определить эмпирически; например, можно отслеживать прогресс пациента, проводя периодическую оценку и соответствующим образом корректируя дозу. Кроме того, можно проводить межвидовой пересчет дозировок при помощи хорошо известных в данной области техники методов (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00242] Известны многочисленные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (См., например, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются этим, интрадермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку толстой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

[00243] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки, для доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению можно применять шприц-ручку. Такой шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции из картриджа и опустошения картриджа пустой картридж легко снять и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовом шприце-ручке сменного картриджа нет. Одноразовый шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от

фармацевтической композиции утилизируют все устройство.

[00244] Для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению можно применять множество видов многоразовых шприцов-ручек и автоинжекторов. Примеры включают, но не ограничиваются этим AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручки DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), ручки HUMALOG MIX 75/25™, ручки HUMALOG™, ручки HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручки BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), если называть только некоторые. Примеры одноразовых шприцов-ручек, которые можно применять для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, ручки SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EIPEN (Dey, L.P.) и ручки HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), если называть только некоторые.

[00245] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять при помощи системы для контролируемого высвобождения. В одном варианте реализации настоящего изобретения можно использовать насос (См. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте реализации изобретения можно использовать полимерные материалы; См., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте реализации изобретения систему для контролируемого высвобождения можно размещать вблизи мишени для композиции, что, таким образом, приводит к необходимости только в части системной дозы (См., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы для контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[00246] Инъецируемые препараты могут включать дозировочные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Инъецируемые препараты можно готовить общеизвестными способами. Например, инъецируемые препараты можно готовить, например, путем растворения, суспендирования или эмульсифицирования описанного выше антитела или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно используемой для инъекций. Из водных сред для инъекций можно назвать, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и

т.д., которые можно применять в комбинации с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионный сурфактант [например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтилен (50 моль) – аддукт гидрогенизированного касторового масла)], и т.д. В качестве масляных сред применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют подходящую ампулу.

[00247] Описанные выше фармацевтические композиции для перорального и парентерального применения преимущественно готовят в дозирочных формах в виде одноразовой дозы, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие дозирочные формы в виде одноразовой дозы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Содержание вышеуказанного антитела в общем случае составляет от около 5 до около 500 мг на дозирочную форму в виде одноразовой дозы; в частности, в случае инъекции, предпочтительно, чтобы содержание вышеуказанного антитела составляло от около 5 до около 100 мг, а в случае других дозирочных форм – от около 10 до около 250 мг.

Терапевтическое применение антигенсвязывающих молекул

[00248] В настоящее изобретение включены способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей анти-CD3 антитело или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает CD3 и антиген-мишень (например, CD20). Терапевтическая композиция может содержать любые раскрытые в данном документе антитела или биспецифические антигенсвязывающие молекулы и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Употребляемое в данном документе выражение «нуждающийся в этом субъект» означает человека или отличное от человека животное, у которого проявляется один или более симптомов или признаков рака (например, субъекта, экспрессирующего опухоль или страдающего от любого из перечисленных ниже видов рака), или для которого будет каким-либо другим образом полезно ингибирование активности CD20 или снижение числа В-клеток CD20+, или регрессия CD20+ В-клеточных опухолей.

[00249] Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению (и содержащие их фармацевтические композиции) применимы, помимо прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором целесообразна стимуляция, активация и/или таргетирование иммунного ответа. В частности, анти-

CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для облегчения, предотвращения и/или снижения степени любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью CD20 или пролиферацией В-клеток CD20+. Механизм действия, благодаря которому осуществляются терапевтические способы согласно изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих CD20, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством апоптоза, фагоцитоза или комбинации двух или более из этих механизмов или сходных цитотоксических механизмов. Клетки, экспрессирующие CD20, которые можно ингибировать или уничтожать при помощи биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению, включают, например, онкогенные В-клетки.

[00250] Снижение опухолевой нагрузки или регрессия опухоли включает частичное или полное исчезновение опухоли или опухолей у субъекта. Понятно, что регрессия опухоли отображает тенденцию к снижению опухолевой нагрузки или снижению тяжести состояния заболевания. Таким образом, регрессия представляет собой прогрессирующее снижение определяемых злокачественных образований в организме, включая снижение размера опухоли и/или снижение числа опухолей. Снижение развития опухоли включает частичное или полное ингибирование или подавления дальнейшего роста опухоли или роста новых опухолей.

[00251] Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для таргетирования и лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге или оболочке головного мозга, ротовой части глотки, легких и бронхах, желудочно-кишечном тракте, мужской и женской репродуктивной системе, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыделительной системе, а также специальных органах чувств, таких как глаза. В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению применяют для лечения одного или более из следующих видов рака: почечно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака простаты, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы или меланомы. В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие

молекулы согласно изобретению применяют для лечения В-клеточного рака (например, ходжкинской лимфомы, неходжкинской лимфомы [НХЛ], лимфобластного лейкоза/лимфомы из В-клеток-предшественников, хронического лимфоцитарного лейкоза из зрелых В-клеток/лимфомы из малых лимфоцитов, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной лимфомы из клеток центра фолликула, В-клеточной лимфомы маргинальной зоны, лейкоза ворсистых клеток, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, плазмацитомы, плазмноклеточной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы).

[00252] Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению вводят в количестве, достаточном, чтобы снизить опухолевую нагрузку, вызвать регрессию опухоли, ингибировать рост опухоли или снизить развитие опухоли у субъекта. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет от около 0,001 мг/кг до около 1 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,4 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,04 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,004 мг/кг.

[00253] В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации настоящего изобретения антигенсвязывающие молекулы применимы для лечения пациента, пораженного В-клеточной лимфомой (например, НХЛ), которая устойчива или не полностью восприимчива к анти-CD20 монотерапии (например, устойчива к терапии ритуксимабом). В соответствии с другими связанными вариантами реализации изобретения предложены способы, включающие введение раскрытой в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы пациенту, пораженному В-клеточной лимфомой (например, НХЛ), которая не поддается анти-CD20 терапии (например, пациенту с неподдающейся лечению ритуксимабом опухолью или с рецидивной или рефрактерной В-клеточной лимфомой). Для того, чтобы проверить, несет ли пациент опухоль, которая устойчива, не полностью восприимчива или не поддается лечению только анти-CD20 терапией, можно использовать аналитические/диагностические методы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухолей и т.д.

[00254] В настоящее изобретение также включены способы лечения остаточного рака у субъекта. Употребляемый в данном документе термин «остаточный рак» означает

наличие или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией.

[00255] В соответствии с определенными аспектами в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией CD20 (например, В-клеточной лимфомы), включающие введение субъекту одной или более описанных в любом месте данного документе биспецифических антигенсвязывающих молекул после получения субъектом анти-CD20 монотерапии (например, после введения фармацевтической композиции, содержащей анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб). Например, в настоящее изобретение включены способы лечения В-клеточной лимфомы, включающие введение пациенту анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после получения субъектом анти-CD20 монотерапии (например, лечения ритуксимабом или эквивалентного лечения).

Комбинированная терапия и препараты

[00256] В настоящее изобретение включены способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любые описанные в данном документе типовые антитела и антигенсвязывающие молекулы в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Типовые дополнительные терапевтические агенты, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, включают, например, антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4 activity), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- α (например, анти-PDGFR- α антитело), ингибитор PDGFR- β (например, анти-PDGFR- β антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, См., например, US 7087411 (также называемый в данном документе «VEGF-ингибирующим слитым белком»), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецепторов VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)),

антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, раскрытое в US 2009/0142354), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (например, анти-FOLH1 антитело), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), а STEAP1 или антагонист STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMPRSS2 (например, анти-TMPRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина), анти-CTLA4 антитело (например, ипилимумаб (MDX-010)), моновалентный антагонист CD20 (например, моновалентное анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб), и т.д.

[00257] Другие агенты, которые целесообразно вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно изобретению, включают иммунные активаторы или ингибиторы. Некоторые иммунные активаторы или ингибиторы представляют собой активаторы или ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные соединения и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 или с их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие раскрытую в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу) также можно вводить в качестве части терапевтической схемы, включающей одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из «ICE»: ифосфамид (например, Ифекс®), карбоплатин (например, Параплатин®), этопозид (например, Этопофос®, Топозар®, Вепезид®, VP-16); «DHAP»: дексаметазон (например, Декадрон®), цитарабин (например, Цитозар-U®, цитозина арабинозид, ага-С), цисплатин (например, Платинол®-AQ); и «ESHAP»: этопозид (например, Этопофос®, Топозар®, Вепезид®, VP-16), метилпреднизолон (например, Медрол®), высокая доза цитарабина, цисплатин (например, Платинол®-AQ).

[00258] В настоящее изобретение также включены терапевтические комбинации любой из приведенных в данном документе антигенсвязывающих молекул и ингибитора одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеуказанных цитокинов, при этом ингибитор является аптамером, антисмысловой молекулой, рибозимом, миРНК, пептителом, нанотелом или фрагментом антитела (например, фрагментом Fab; фрагментом F(ab')₂; фрагментом Fd; фрагментом Fv; scFv; фрагментом dAb; или другими сконструированными молекулами,

такими как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить и/или получать в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или NSAID. Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить в качестве части схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

[00259] Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить непосредственно до, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению (в контексте настоящего описания такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[00260] В настоящее изобретение включены фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению скомбинирована с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте данного документа.

Схемы введения

[00261] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения субъекту можно вводить множественные дозы антигенсвязывающей молекулы (например, анти-CD3 антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает CD20 и CD3) в течение определенного времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту множественных доз антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. В контексте данного документа «последовательное введение» означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в разные временные точки, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). В настоящее изобретение включены способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, за которой следует одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, одна или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

[00262] Термины «начальная доза», «вторичная доза» и «третичная доза» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. Таким образом, «начальная доза» – это доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая «исходной дозой»); «вторичные дозы» – это дозы, которые

вводят после начальной дозы; а «третичные дозы» – это дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут все содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но в общем случае могут отличаться друг от друга в контексте частоты введения. Однако в определенных вариантах реализации изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах может отличаться (например, в большую или меньшую сторону в зависимости от ситуации) во время курса лечения. В определенных вариантах реализации изобретения две или более доз (например, 2, 3, 4 или 5) вводят в начале схемы лечения в качестве «загрузочных доз», а за ними следуют дозы, которые вводят менее часто (например, «поддерживающие дозы»).

[00263] В одном типовом варианте реализации настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Употребляемое в данном документе выражение «непосредственно предшествующая доза» означает дозу антигенсвязывающей молекулы в последовательности из нескольких введений, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00264] Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с CD20 и CD3). Например, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00265] В вариантах реализации изобретения, включающих введение нескольких вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах реализации изобретения, включающих введение нескольких третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы.

Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В альтернативном варианте частота введения вторичных и/или третичных доз пациенту может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может корректироваться в течение курса лечения лечащим врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Диагностические применения антител

[00266] Анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или определения CD3 или CD3-экспрессирующих клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, анти-CD3хCD20 антитело или его фрагмент можно использовать, чтобы диагностировать патологическое состояние или заболевание, характеризуемое aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, низкой экспрессией или отсутствием экспрессии и т.д.) CD3. Типовые диагностические методы анализа для CD3 могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с анти-CD3хCD20 антителом согласно изобретению, при этом антитело метят выявляемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте в диагностических применениях можно использовать немеченое анти-CD3хCD20 антитело в комбинации со вторичным антителом, которое помечено выявляемой меткой. Выявляемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые методы анализа, которые можно применять для выявления или определения CD3 в образце включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[00267] Аналогично, анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или определения CD20 или CD20-экспрессирующих клеток в образце или для диагностирования патологического состояния или заболевания, характеризуемого aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, низкой экспрессией или отсутствием экспрессии и т.д.) CD20.

[00268] Образцы, которые можно использовать в методах диагностического анализа CD3 или CD20 в соответствии с настоящим изобретением, включают любой полученный от пациента образец ткани или жидкости, который содержит выявляемое количество белка CD3 и/или CD20 или его фрагментов при нормальных или патологических состояниях. В

общем случае сначала измеряют уровни CD3 или CD20 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или патологическим состоянием, связанным с аномальным уровнем или активностью CD3 или CD20), чтобы установить базовый или стандартный уровень CD3 или CD20. Затем этот базовый уровень CD3 или CD20 можно сравнивать с уровнями CD3, измеренными в образцах, полученных от индивидов с подозрением на связанное с CD3 или CD20 заболевание или патологическое состояние, соответственно.

ПРИМЕРЫ

[00269] Следующие примеры приведены для того, чтобы представить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и композиции согласно изобретению, и не ограничивают объем того, что авторы считают своим изобретением. Были приняты меры для того, чтобы гарантировать точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать вероятность наличия некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура выражена в градусах Цельсия, а давление соответствует или приближается к атмосферному.

Пример 1. Получение анти-CD3 и анти-CD20 антител

[00270] Известно несколько способов для выделения анти-CD3 или анти-CD20 антител. Полностью человеческие анти-CD3 антитела, применяемые в следующих примерах, выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

[00271] Дополнительные примеры анти-CD3 антител можно применять в указанных способах, а описание таких антител и биологических свойств таких анти-CD3 антител приведено в Международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Типовые анти-CD20 антитела и биологические свойства таких анти-CD20 антител описаны в US 7879984 и Международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

[00272] Анти-CD20 антитело и способ создания антитела, применяемого для конструирования биспецифических антител в этом примере, соответствуют описанным в US 7879984.

[00273] Обозначения аминокислотных последовательностей переменных областей

тяжелой и легкой цепей и CDR, применяемых для конструирования анти-CD3 антигенсвязывающего плеча и анти-CD20 связывающего плеча биспецифических антител согласно изобретению, приведены в Таблице 1. Соответствующие обозначения нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 2.

Таблица 1: Обозначения аминокислотных последовательностей (SEQ ID NO)

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Анти-CD20	2	4	6	8	18	20	22	24
Анти-CD3	10	12	14	16	18	20	22	24

Таблица 2: Обозначения нуклеотидных последовательностей (SEQ ID NO)

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Анти-CD20	1	3	5	7	17	19	21	23
Анти-CD3	9	11	13	15	17	19	21	23

Пример 2. Получение биспецифических антител, которые связывают CD3 и CD20

[00274] Биспецифические антитела, содержащие анти-CD3-специфический связывающий домен и анти-CD20-специфический связывающий домен, конструировали с вышеуказанными последовательностями, используя стандартную методологию, в которой тяжелую цепь и когнатную легкую цепь из анти-CD3 антитела комбинировали с тяжелой цепью из анти-CD20 антитела.

[00275] Таким образом, биспецифические антитела, созданные в соответствии с настоящим Примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т.е. связывающих плеча). Первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из анти-CD20 антитела («CD20-VH»), сопряженную с переменной областью легкой цепи, полученной из анти-CD3 антитела («CD3-VL»). Сопряжение CD20-VH/CD3-VL образует антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD20. Второй антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из анти-CD3 антитела («CD3-VH»), сопряженную с переменной областью легкой цепи, полученной из анти-CD3 антитела («CD3-VL»). Сопряжение CD3-VH/CD3-VL образует антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD3. Во всех биспецифических антителах, созданных в данном примере, использовали один и тот же CD20-VH, обозначаемый «CD20-VH-A».

[00276] Константный домен тяжелой цепи (CH) дикого типа для каждой тяжелой цепи замещали химерным CH при помощи рекомбинатных технологий. CH одного

связывающего плеча (например, анти-CD3 связывающего плеча) содержит мутацию в СН3-области СН, которая облегчает выделение биспецифического антитела.

[00277] Обобщенная информация по составным частям различных биспецифических антител, созданных в соответствии с этим Примером, приведена в Таблице 3 и Таблице 4.

Таблица 3: Обозначения аминокислотных последовательностей

Название биспецифического антитела	Анти-CD20 антигенсвязывающий домен			Анти-CD3 антигенсвязывающий домен		
	Вариабельн. область тяжелой цепи	Константн. область тяжелой цепи	Вариабельн. область легкой цепи	Вариабельн. область тяжелой цепи	Константн. область тяжелой цепи	Вариабельн. область легкой цепи
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Антитело 1	2	26	18	10	28	18
Антитело 2	2	30	18	10	32	18

Таблица 4: Обозначения нуклеотидных последовательностей

Название биспецифического антитела	Анти-CD20 антигенсвязывающий домен			Анти-CD3 антигенсвязывающий домен		
	Вариабельн. область тяжелой цепи	Константн. область тяжелой цепи	Вариабельн. область легкой цепи	Вариабельн. область тяжелой цепи	Константн. область тяжелой цепи	Вариабельн. область легкой цепи
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Антитело 1	1	25	17	9	27	17
Антитело 2	1	29	17	9	31	17

[00278] В Таблицах 5 и 6 приведены обозначения аминокислотных последовательностей для различных вариабельных областей тяжелой цепи (Таблица 5) и вариабельных областей легкой цепи (Таблица 6) с соответствующими CDR биспецифических антител из данного Примера.

Таблица 5: Обозначения аминокислотных последовательностей тяжелой цепи

Обозначение тяжелой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи (HCVR)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Константная область тяжелой цепи (CH)
CD20-VH-CH-A	2	4	6	8	26 или 28, или 30, или 32
CD3-VH-CH-A	10	12	14	16	

Таблица 6: Обозначения аминокислотных последовательностей легкой цепи

Обозначение легкой цепи	Вариабельная область легкой цепи (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	18	20	22	24

[00279] Кроме того, в Таблицах 7 и 8 приведены обозначения последовательностей для нуклеотидных последовательностей, кодирующих различные вариабельные области тяжелой цепи (Таблица 7), константные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи (Таблица 8) с соответствующими CDR биспецифических антител из данного Примера.

Таблица 7: Обозначения нуклеотидных последовательностей тяжелой цепи

Обозначение тяжелой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи (HCVR)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Константная область тяжелой цепи (CH)
CD20-VH-A	1	3	5	7	25 или 27, или 29, или 31
CD3-VH-A	9	11	13	15	

Таблица 8: Обозначения нуклеотидных последовательностей легкой цепи

Обозначение легкой цепи	Вариабельная область легкой цепи (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	17	19	21	23

[00280] Кроме описанных выше биспецифических антител в некоторых экспериментах, описанных в следующих Примерах, использовали также следующие контрольные антитела:

[00281] Контрольное антитело 1: Моноклональное антитело «ОКТ-3» против человеческих Т-клеточных поверхностных антигенов, описанное в US 4361549 и доступное из гибридомы CRL-8001 (Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA).

[00282] Контрольное антитело 2: Антитело «SP34», реактивное против эpsilon-цепи

комплекса Т3 на клетках человеческих Т-лимфоцитов, доступное от BD Pharmagen, Cat # 55052.

[00283] Контрольное антитело 3: Анти-CD20 терапевтическое антитело с последовательностями тяжелой и легкой цепей Ритуксана® (ритуксимаб), раскрытое в US 5736137.

[00284] (Контрольное антитело) 4: Также известное как CD3хCD20 антитело с Fc дикого типа (дт Fc), это антитело было создано аналогично вышеописанным способам и содержит анти-CD20 плечо, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/18 (аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24) и CH-область IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 45); и анти-CD3 плечо, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 10/18 (аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24) и CH-область IgG1 дикого типа с двумя аминокислотными модификациями (SEQ ID NO: 48) в домене CH3 для облегчения выделения. CD3хCD20 антитело-дт Fc (антитело 4) может называться равноценным контрольным антителом, имеющим Fc-домен IgG1 дикого типа (т.е. равноценным в отношении антигенсвязывающих доменов CD3хCD20-химерный Fc антител согласно изобретению), в целях сравнения эффекторных функций антител или других свойств с антителами, имеющими другие последовательности или структуру Fc-домена.

[00285] Контрольное антитело 5: Анти-FcD1 моноклональное антитело связывает кошачий антиген и не характеризуется перекрестной реактивностью в отношении человеческого CD20 или CD3. Это IgG1 неспецифическое контрольное антитело получали способами, описанными в публикации согласно PCT № WO2013/166236, опубликованной 7 ноября 2013 г.

[00286] Контрольное антитело 6: Анти-FcD1 антигенсвязывающий домен, описанный в публикации согласно PCT № WO2013/166236, конструировали, как описано в данном документе, так, чтобы он содержал химерный Fc-домен IgG4 аналогично с Ab 1. Контрольное Ab 6 не характеризуется перекрестной реактивностью в отношении человеческого CD20 или CD3, но имеет сходные с Ab 1 эффекторные функции.

Пример 3. Конструирование химерной тяжелой цепи

[00287] Получение химерных тяжелых цепей, например, химерной CH IgG4 (SEQ ID NO: 26) и химерной CH IgG1 (SEQ ID NO: 30), осуществляли при помощи стандартных методов клонирования. Сначала получали химерную IgG4 CH посредством двухэтапного

процесса ПЦР-амплификации. Два ПЦР-фрагмента, фрагмент 1 и 2, амплифицировали, используя стартовую векторную конструкцию pR001, содержащую ДНК hIgG4 CH дикого типа с применением пар праймеров, фланкирующих CH-область, P1-P2 и P3-P4, соответственно. (См. Таблицу 9 ниже) Праймеры вносили в фрагменты как необходимую нижнюю шарнирную последовательность IgG2 (которая кодирует SEQ ID NO: 52), так и фланкирующие рестрикционные сайты. Затем эти два фрагмента соединяли при помощи ПЦР-праймеров P2 и P4. Полученную в результате последовательность вставляли в pR001 посредством рестрикционных сайтов Xho1-Not1, получая векторную конструкцию pR002, которая содержит химерную IgG4 CH, содержащую нижнюю шарнирную последовательность IgG2. Последовательность подтверждали при помощи праймеров P10 и P11.

[00288] Кроме того химерную IgG1 CH получали при помощи многоэтапной ПЦР-амплификации. Фрагмент 1а получали, используя праймеры P2 и P5 (См. Таблицу 9 ниже), с матрицы pR85503 (которая содержит ДНК человеческой IgG1 CH дикого типа). Фрагмент 2а амплифицировали праймерами P6 и P8, используя в качестве матрицы pR002 (содержащую ДНК химерной IgG4 CH). Фрагмент 3 получали, используя праймеры P7 и P9, с матрицы pR003 (ДНК hIgG1 CH дикого типа; SEQ ID NO: 45). Фрагменты 1а и 2а соединяли при помощи праймеров P2 и P8, что приводило к получению фрагмента 4. Соединение фрагментов 2а и 3 при помощи праймеров P6 и P9 приводило к получению фрагмента 5. Затем фрагменты 4 и 5 сливали при помощи праймеров P2 и P9. Полученную в результате последовательность вставляли в pR001 посредством рестрикционных сайтов Xho1-Not1, получая конструкцию pR004, которая содержит константную область IgG1 с нижней шарнирной областью IgG2 и CH2-доменом IgG4. Последовательность подтверждали при помощи праймеров P10 и P11.

Таблица 9: Праймеры для ПЦР-получения нуклеотидных конструкций химерной Сн

Название праймера	Последовательность праймера (SEQ ID NO)
P1	5'-TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGGACGGGTGGCACGGGTCTGTTGGACACCGT-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 63)
P2	5'-AAG CTT ATA TCTG AG CT CT AG ATT GGGAACCCGGGTCTCT-3' (SEQ ID NO: 64)
P3	5'-CCCACCGTGCCCAGCACCACT GT GGCAGG ACCAT CAGT CTTCTT GTT CCCCCAAAA-3' (SEQ ID NO: 65)
P4	5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCC GGCG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 66)
P5	5'-CTCGGGTTTAGAACA CTGTTT T GAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCTGTTGGACACCGT-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 67)
P6	5'-AAAT CTT GT G ACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCACT GTG-3' (SEQ ID NO: 68)
P7	5'-GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC-3' (SEQ ID NO: 69)

P8	5'-CTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 70)
P9	5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCCGGCG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 71)
P10	5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (SEQ ID NO: 72)
P11	5'-AT AC ATT ATACGAAGTTATACCGGTA-3' (SEQ ID NO: 73)

Пример 4. CD20 x CD3 биспецифические антитела избирательно связывают Jurkat, Raji и обезьяньи Т-клетки по сравнению с моноспецифическими антителами

[00289] CD3xCD20 антитело-дт Fc (контрольное антитело 4) сравнивали с моноспецифическими контрольными антителами, приведенными в Примере 2, при помощи метода связывания FACS в отношении их способности связываться с Jurkat (CD3+, CD20- линия Т-клеток человека), Raji (CD3-, CD20+ линия В-клеток человека) или МКПК яванского макака (клетки «mkT»).

[00290] Данные FACS получали, используя следующий протокол: Клетки при 2×10^5 на лунку инкубировали с серийными разведениями антител в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали и добавляли соответствующее вторичное антитело (клетки Jurkat, RAJI) или коктейль из вторичных антител (для МКПК яванского макака) и дополнительно инкубировали в течение 30 минут. После инкубации клетки промывали, пересуспендировали в охлажденном ФСБ, содержащем 1 % БСА и анализировали методом проточной цитометрии на BD FACS Canto II. Гейтинг клеток Jurkat и Raji проводили относительно бокового и переднего разлета, в то время как гейтинг Т-клеток яванского макака проводили как для популяции CD2+CD4+. EC₅₀ для титрования клеточного связывания определяли, используя программное обеспечение Prism, со значениями, рассчитанными при помощи 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа. Результаты приведены в Таблице 10.

Таблица 10. EC₅₀-значения связывания (молярные) для моноспецифических и CD3xCD20 биспецифических антител

Антитело	FACS - Jurkat	FACS - RAJI	FACS – клетки mkT
Контрольное 1 (анти-CD3)	1,96E-10	НС	НС
Контрольное 2 (анти-CD3)	(+)	НС	7,03E-11
Контрольное 3 (анти-CD20)	Нет связывания	(+)	НС
Контрольное 4	3,85E-08	5,99E-08	8,74E-06
(Анти-CD3xCD20, CH дикого типа)			

(+) Значения EC₅₀ не определены, но связывание наблюдалось; НС – нет связывания; НИ – не исследовали

[00291] Как показано в Таблице 10 панель исследуемых антител демонстрировала диапазон аффинности связывания для различных линий клеток в зависимости от их

специфичности. Биспецифическое контрольное антитело 4 продемонстрировало способность связывать целевые линии как человека, так и яванского макака. Контрольное антитело 4 содержит такие же самые анти-CD3хCD20 переменные области, что и антитело 1 и антитело 2 согласно изобретению, но при этом имеет СН-область IgG1 дикого типа. Анти-CD3 контроль 1 (ОКТ3), анти-CD3 контроль 2 (SP34) и анти-CD20 контроль 3 связывались с Jurkat, Т-клетками яванского макака и RAJI, соответственно.

Пример 5. CD20 х CD3 биспецифические антитела с СН дикого типа индуцируют цитотоксичность в отношении клеток Raji в присутствии активированных Т-клеток [00292] Способность CD20 х CD3 биспецифических антител перенаправлять опосредованное Т-клетками уничтожение на CD20-экспрессирующие клетки Raji исследовали в *in vitro* анализе цитотоксичности. Кроме того, также исследовали способность биспецифических и родительских анти-CD3 антител уничтожать клетки U937 посредством взаимодействий Fc/FcR.

[00293] Анализ уничтожения с кальцеином проводили, используя следующий протокол: МКПК человека и яванского макака выделяли при помощи ficoll-Plaques или при помощи среды для разделения клеток Lympholyte Mammal, соответственно. Выделенные МКПК активировали в течение нескольких дней средой, содержащей рекомбинантный человеческий IL-2 (30 Е/мл) и Т-клеточные активационные гранулы (анти-CD3/CD28 для МКПК человека, анти-CD2/CD3/CD28 для МКПК яванского макака).

[00294] Клетки-мишени (Raji для CD20 опосредованного уничтожения и U937 для FcR опосредованного уничтожения) метили кальцеином и инкубировали с активированными Т-клетками при соотношении эффектор:мишень 10:1, используя 3-кратные серийные разведения антител в течение 3 часов при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали, а супернатанты переносили в светопроницаемый черный планшет с прозрачным дном для флуоресцентного анализа. EC₅₀, определяемую как молярная концентрация биспецифического антитела, которая индуцирует 50 %-ную цитотоксичность, определяли при помощи Prism. Значения рассчитывали при помощи 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа. Результаты обобщены в Таблице 10.

Таблица 11. Значения EC₅₀ для CD20 х CD3-индуцированной цитотоксичности в отношении клеток Raji и U937

Антитело	Цитотоксичность Raji	Цитотоксичность Raji	Цитотоксичность U937
	Человеческие клетки [М]	Обезьяньи клетки [М]	Человеческие Т- клетки [М]
Контрольное Ab 1 (анти-CD3)	НА	НА	3,04E-12
Контрольное Ab 4	5,63E-11 *	1,27E-12*	8,86E-11 *

(Анти-CD3хCD20)			
-----------------	--	--	--

(*) Данные представляют собой медианные величины по 3 или более независимым анализам. Данные без (*) являются типовыми/средними значениями по 1 или 2 независимым анализам. НА – нет активности

[00295] Как показано в Таблице 11, биспецифическое CD20 х CD3 антитело, содержащее анти-CD3 плечи, специфические для человека и перекрестно реактивные для яванского макака, и СН-область IgG1 дикого типа, было способно специфически перенаправлять цитотоксичность на клетки Raji в присутствии активированных человеческих Т-клеток. В присутствии активированных Т-клеток яванского макака уничтожение Raji происходило, когда их инкубировали с контрольным биспецифическим антителом Ab 4, которое содержит анти-CD3 плечо, которое активирует обезьяньи Т-клетки. Как биспецифическое антитело, так и контрольное Ab 1 (анти-CD3 mAb) продемонстрировали активность в анализе U937 Fc/FcR зависимого уничтожения. Эту активность можно блокировать путем добавления в реакцию блокирующего неспецифического человеческого IgG (Данные не показаны).

Пример 6. CD20 х CD3 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную эффекторную функцию в анализе КЗЦ

[00296] CD20хCD3 биспецифические антитела с химерными СН-областями (антитело 1 и антитело 2), описанные выше в Примере 2, конструировали так, чтобы изменить или снизить эффекторную функцию. По сравнению с антителами, содержащими константную область тяжелой цепи дикого типа (дт) изотипа IgG1 (контрольное Ab 4), аминокислотные замены в СН-области могут препятствовать способности Ig Fc связываться со своим(и) рецептором(ами). Следовательно, могут измениться сигнальные и иммунные ответы, такие как активация В-клеток или фагоцитоз. Исследовали действие аминокислотных модификаций в СН-области на эффекторную функцию комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) (в этом примере) и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) (См. Пример 7).

[00297] Чтобы исследовать действие антитела 1 и антитела 2 на эффекторную функцию КЗЦ, CD20-экспрессирующие клетки Raji (мишени) (5000/лунка) или клетки Daudi высевали в присутствии 5 % человеческого сывороточного комплемента. Серийные разведения антитела 1, антитела 2 и контрольных антител, начиная со 100 нМ, добавляли к клеткам в течение 4 ч при 37⁰С. Лизис клеток-мишеней определяли при помощи набора CytoTox Glo™ (Promega) и рассчитывали процент цитотоксичности.

[00298] Процент цитотоксичности рассчитывали, используя уравнение:

% цитотоксичности = $((L_S - L_{SR}) / (L_{MR} - L_{SR})) * 100$ %, где L_{SR} – базовая люминесценция клеток-мишеней, а L_{MR} – максимальное высвобождение кальцеина из клеток, лизированных

дигитонином. EC_{50} для цитотоксичности определяли при помощи программного обеспечения Prism (GraphPad). Значения рассчитаны при помощи 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа и приведены в Таблице 12 и на Фигурах 5А и 5В.

[00299] КЗЦ-активность антитела 1 и антитела 2 против клеток Daudi и Raji была значительно снижена по сравнению с соответствующим антителом, содержащим константную область тяжелой цепи дикого типа. См. Таблицу 12 и Фигуры 5А/В. Некоторую степень КЗЦ-активности наблюдали для антитела 1 в случае клеток Raji, однако, общие результаты показывают, что химерные антитела демонстрировали более слабые эффекторные ответы, чем контрольные антитела с дт IgG1 Fc.

Таблица 12: CD20xCD3 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную активность в анализе КЗЦ для эффекторных функций

КЗЦ				
Клетка-мишень→	Daudi		Raji	
	EC_{50} [М]	Максимальная цитотоксичность	EC_{50} [М]	Максимальная цитотоксичность
Контрольное Ab 4	6,12E-08	~95	1,98E-08	~85
Ab 1	НА	НА	2,86E-08	~45
Ab 2	НА	НА	3,49E-08	~10

НА: нет активности

Пример 7. CD3xCD20 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную эффекторную функцию в анализе АЗКЦ

[00300] Чтобы исследовать действие антитела 1 и антитела 2 по сравнению с биспецифическим антителом с СН-областями дикого типа (и идентичными вариабельными областями) на эффекторную функцию АЗКЦ, свежевыделенные нестимулированные CD56-положительные НК-клетки или NK92-клетки, сконструированные так, чтобы экспрессировать высокоаффинный V-аллель FcγR1A, высевали с мечеными кальцеином CD20-положительными клетками Raji или Daudi в присутствии антител с химерной СН (антитело 1 и антитело 2) и контрольного антитела с дт-СН (контрольное антитело 4). Отслеживали высвобождение кальцеина из клеток мишеней и определяли процент цитотоксичности. Процент цитотоксичности и EC_{50} рассчитывали, как описано выше для анализа КЗЦ. Результаты приведены в Таблице 13 и на Фигурах 6А и 6В.

[00301] Антитела с химерной СН – антитело 1 и антитело 2 – не опосредовали активность АЗКЦ (Таблица 13) против клеток Raji или Daudi.

Таблица 13: CD3 x CD20 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-

области, демонстрируют сниженную активность в анализе АЗКЦ для эффекторных функций

ADCC				
Клетка-мишень→	Daudi		Raji	
	EC ₅₀ [M]	Максимальная цитотоксичность (%)	EC ₅₀ [M]	Максимальная цитотоксичность (%)
Контрольное Ab 4	1,87E-10	~70 [#]	1,48E-09	~65 [#]
Ab 1	HA	HA	HA	HA
Ab 2	HA	HA	HA	HA

HA: нет активности; #: фоновая цитотоксичность ~20 %

Пример 8. Полученные методом поверхностного плазмонного резонанса аффинности связывания и кинетические константы химерных антител

[00302] Анти-CD3 x анти-CD20 биспецифические антитела, имеющие химерные константные области тяжелой цепи, – антитело 1 и антитело 2 – анализировали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Biacore), чтобы определить их кинетические параметры связывания с Fcγ-рецепторами человека и яванского макака. Изотипические контроли, а именно изотипический контроль дт-IgG1 и изотипический контроль дт-IgG4 CPPC, исследовали сходным образом.

[00303] Вкратце, ППР-эксперименты проводили при 25°C на инструменте Biacore T200 с применением покрытого карбоксиметилдекстраном (CM-5) чипа. Мышиное моноклональное анти-пентагистидин антитело (GE Healthcare) иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа CM-5 при помощи стандартного аминного сопряжения. Проводили захват 140RU-376RU His-меченых человеческих или обезьяньих белков FcγR на анти-пентагистидин амин-сопряженном чипе CM-5, а маточные растворы антител пропускали при 20 мкл/мин в течение 2,5 мин через захваченные белки. Отслеживали связывание mAb и, в случае низкоаффинных рецепторов, просчитывали равновесное связывание для устойчивого состояния. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и аппроксимации данных 1:1 моделью связывания при помощи программного обеспечения для построения кривых Scrubber 2.0. Равновесные константы диссоциации (K_d) и диссоциативные времена полужизни ($t_{1/2}$) для связывания рассчитывали из кинетических констант как: K_d (M) = k_d / k_a ; и $t_{1/2}$ (мин) = $(\ln 2) / (60 * k_d)$.

Таблица 14: Кинетические параметры связывания для антител с тяжелыми цепями дикого типа (дт) и химерными тяжелыми цепями

Связывание с His-захваченным человеческим FcγRI при 25°C

Антитело	k_a ($M^{-1}sec^{-1}$)	K_d ($^1sec^{-1}$)	K_d ($10^{-9}M$)	$T^{1/2}$ (мин)
Изотипический контроль дт-IgG1	1,74E+05	7,48E-04	4,3	15
Изотипический контроль дт-IgG4 CPPC	1,71E+05	2,36E-03	13,9	5
Ab 1	НС	НС	НС	НС
Ab 2	НС	НС	НС	НС

НС: Связывание не выявлено

[00304] Как демонстрируют результаты в Таблице 14, биспецифические антитело 1 и антитело 2 не проявляют связывания с человеческим $Fc\gamma RI$ по сравнению с антителами, имеющими СН-область дикого типа (дт) hIgG1 или hIgG4-CPPC, в ППР-анализе. Биспецифические антитела с химерными тяжелыми цепями согласно данному изобретению также проявляют слабое или отсутствующее связывание в отношении нескольких низкоаффинных человеческих $FcR\gamma$ -рецепторов (например, слабое связывание с $FcR\gamma IIA$, $FcR\gamma IIB$, и отсутствие выявляемого связывания с человеческим $FcR\gamma I$, $FcR\gamma IIIA$ или $FcR\gamma IIIB$) по сравнению с антителами с Fc-последовательностью дт hIgG1 или hIgG4-CPPC Fc (Таблица 15, ниже).

Таблица 15: Равновесное связывание в устойчивом состоянии для антител с тяжелыми цепями дикого типа (дт) и химерными тяжелыми цепями

Связывание с His-захваченными низкоаффинными человеческими $Fc\gamma R$ -рецепторами при 25°C									
Исследуемое антитело	Значения K_d (10^{-6} M) для связывания низкоаффинных $Fc\gamma R$ с антителами, содержащими химерные тяжелые цепи								
	челов. $Fc\gamma RI$ A (H131)	челов. $Fc\gamma RIIA$ (R131)	$Fc\gamma RIIA$ яв. макака	челов. $Fc\gamma RIIB$	$Fc\gamma RIIB$ яв. макака	челов. $Fc\gamma RIIIA$ (V176)	челов. $Fc\gamma RIIIA$ (F176)	$Fc\gamma RIIIA$ яв. макака	челов. $Fc\gamma RIIB$
Изотип. контроль дтIgG1	1,1	2	4,2	2	4,2	1,5	1,3	0,6	2,3
Изотип. контроль дтIgG4 (CPPC)	12	10	19,3	9,8	9,6	10	26	5,8	НС
Ab 1	12	19,3	23,1	123	13,9	НС	НС	66,3	НС
Ab 2	11,7	20,5	23,5	233	14,6	НС	НС	42,4	НС

НС: Не выявлено связывания

Пример 9. Фармакокинетический профиль химерных антител

[00305] Оценивали токсикокинетический профиль антитела 1 и антитела 2, получая образцы крови от самцов яванских макаков (3 животных/группу обработки), получавших одну 30-минутную ВВ инфузию, за которой следовал 12-недельный период наблюдения. Образцы крови для проведения токсикокинетического анализа общей концентрации лекарственного препарата брали перед дозированием и после дозирования через 5 минут и 5, 24, 48, 72 и 168 часов, и 14, 21, 35, 49, 66 и 84 дня. Полученные в результате образцы сыворотки анализировали при помощи прямого ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), чтобы определить общую концентрацию препарата Ab 1 или Ab 2. Токсикокинетику исследуемых антител оценивали методом некомпартментного анализа (Phoenix WinNonLin), чтобы определить фармакокинетические параметры. Результаты приведены в Таблице 16 (ППК = площадь под кривой концентрация-время; $C_{\text{макс}}$ = наблюдаемая максимальная концентрация в сыворотке).

Таблица 16: Фармакокинетический профиль химерных антител в сыворотке яванских макаков после одной внутривенной инфузии яванским макакам

Параметр	Единицы	1 мг/кг Ab 2		1 мг/кг Ab 1	
		Среднее	СО	Среднее	СО
$C_{\text{макс}}$	мкг/мл	33,4	3,79	26,0	4,72
$C_{\text{макс}}/\text{Доза}$	кг*мкг/мл/мг	33,4	3,79	26,0	4,72
$t_{\text{макс}}$	день	0,0243	0	0,0243	0
ППК _{0-168 ч}	день.мкг/мл	100	20,1	61,1	8,04
ППК _{0-168 ч} / Доза	день*кг*мкг/мл/мг	100	20,1	61,1	8,04
T1/2	День	8,14	1,15	14,0	2,64

[00306] После одной внутривенной дозы в 1,0 мг/кг Ab 1 и Ab 2 яванским макакам наблюдали среднюю пиковую концентрацию ($C_{\text{макс}}$) в 33,4 и 26,0 мкг/мл, соответственно, и значения ППК_{0-168 ч} в 100 и 61,1 день*мкг/мл, соответственно. Оцененное кажущееся терминальное время полужизни этих двух молекул составило 8,14-14,0 дней. Эти данные указывают на то, что постоянное воздействие Ab 1 и Ab 2 сохранялось у всех животных в течение большей части 12-недельного периода наблюдения и это воздействие было сопоставимо для всех групп обработки. Для исследуемых антител не наблюдали видимой иммуногенности. Общие фармакокинетические профили Ab 1 и Ab 2 типичны для моноклональных антител при дозировании яванских макаков.

Пример 10. CD3 x CD20 биспецифические антитела могут снижать число В-клеток CD20+ у яванских макаков при более низких дозах, чем моноспецифическое антитело

[00307] Чтобы определить *in vivo* эффективность введения CD3хCD20 биспецифического антитела 1 и контрольного антитела 4, методом FACS исследовали изменение в уровнях В-клеток CD20⁺ в периферической крови яванских макаков после введения анти-CD3хCD20 биспецифического антитела по сравнению с моноспецифическим анти-CD20 антителом (контрольное Ab 3). Исследование проводили на самцах яванских макаков (*Macaca fascicularis*), разделенных на 8 групп дозирования по 3 животных на группу дозирования, следующим образом: Группа 1 получала плацебо (введение контрольного базового раствора); Группа 2 получала моноспецифическое антитело (контрольное Ab 3; ритуксан) при 30 мг/кг (30 мг/кг для обезьян эквивалентны человеческой дозе 375 мг/м², которая считается максимальной клинической дозой); Группа 3 получала биспецифическое CD3хCD20 контрольное антитело 4 при 0,01 мг/кг; Группа 4 – антитело 4 при 0,1 мг/кг; Группа 5 – антитело 4 при 1 мг/кг; Группа 6 – антитело 1 при 0,01 мг/кг; Группа 7 – антитело 1 при 0,1 мг/кг; и Группа 8 – антитело 1 при 1 мг/кг. Кровь брали на -7 день и -4 день перед дозированием животных. Дозы препаратов антител или базового раствора (плацебо) вводили путем в.в. инфузии и брали кровь через 2, 4 и 7 дней после дозирования. Образцы крови анализировали методом FACS в отношении маркеров В-клеток (CD20; Таблица 17) и Т-клеток (CD3, См. ниже) и определяли абсолютное количество этих типов клеток.

[00308] Вкратце, 100 мкл крови инкубировали с 1,5 мл лизисного буфера RBC в пробирках Эппендорфа в течение трех минут. Клетки центрифугировали в течение пяти минут при 0,4хg, промывали 2х раствором FACS (ФСБ + 3 % ФБС) и блокировали в течение 10 минут при комнатной температуре Fc-блокирующим реагентом. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 4⁰С с антителами, напрямую конъюгированными с флуоресцентными реагентами hCD45 и CD20. Количественное определение подгрупп В-клеток (CD20) или подгрупп Т-клеток (CD3) проводили сначала посредством стратегии гетерогенного гейтинга, заключающейся в флуоресцентном окрашивании CD45 и демаркации характеристик бокового разлета (SSC) (CD45brightSSCdim) для выделения популяций белых кровяных телец (БКТ). Затем проводили определение популяций В-клеток, используя релевантные флуоресцентно меченые антитела (CD20 APC-Cy7). После окрашивания клетки два раза промывали перед получением данных FACS на цитометре FACSCanto и анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo. Результаты показаны в Таблице 17 и на Фигурах 11А и 11В.

Таблица 17: Число циркулирующих CD45-, CD20-положительных клеток в периферической крови обезьян после обработки

	Клетки CD20+ (ЕЗ/мкл) в день исследования					
Обработка	Животное,	-7	-4	2	4	7

	ID №					
Плацебо	78	1,87	2,69	1,85	2,09	1,62
	79	1,28	1,31	0,98	1,24	0,98
	80	2,41	2,90	2,23	2,71	1,78
Контрольное Ab 3	81	0,71	0,80	0,00	0,00	0,00
	82	0,97	2,49	0,00	0,00	0,00
	83	0,71	1,28	0,00	0,00	0,00
CD3xCD20-дтFc (Ab 4) 0,01 мг/кг	84	2,00	2,82	0,03	0,02	0,03
	85	1,23	1,96	0,00	0,00	0,00
	88	1,50	2,29	0,01	0,00	0,00
CD3xCD20-дтFc (Ab 4) 0,1 мг/кг	87	0,79	1,20	0,00	0,00	0,00
	88	1,72	3,05	0,00	0,00	0,00
	89	0,28	0,60	0,00	0,00	0,00
CD3xCD20-дтFc (Ab 4) 1 мг/кг	90	0,63	1,02	0,00	0,00	0,00
	91	0,66	0,65	0,00	0,00	0,00
	92	0,56	1,50	0,00	0,00	0,00
Ab 1 0,01 мг/кг	93	1,16	1,96	0,00	0,00	0,00
	94	0,72	1,49	0,00	0,04	0,00
	95	1,95	1,94	0,02	0,02	0,01
Ab 1 0,1 мг/кг	96	0,48	0,60	0,00	0,00	0,00
	97	1,30	1,82	0,00	0,00	0,00
	98	4,87	5,00	0,00	0,00	0,00
Ab 1 1 мг/кг	99	0,23	0,34	0,00	0,00	0,00
	00	1,39	1,93	0,00	0,00	0,00
	01	2,29	2,30	0,00	0,00	0,00

[00309] Как показано в Таблице 17 и на Фигуре 11A, введение CD3xCD20 биспецифических антител и анти-CD20 моноспецифического антитела приводило к снижению числа циркулирующих В-клеток до базового уровня в первую временную точку, для которой проводили измерения (день 2). Такое снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных. Сниженное число В-клеток в биспецифических группах сохранялось в течение 1 недели после дозирования 1 мг/кг биспецифических антител, и также сниженное число В-клеток сохранялось в биспецифических группах, обработанных дозами 0,01 и 0,10 мг/кг.

[00310] Также в этом эксперименте отслеживали уровни Т-клеток (CD3+) при помощи флуоресцентно меченых анти-CD3 антител. Временное снижение числа Т-клеток наблюдали на 2 день после дозирования в группах биспецифических антител (Ab 4 и Ab 1; все дозы). Снижение числа Т-клеток (ниже базового уровня) не наблюдали в контрольной группе базового раствора (плацебо) или контрольной группе Ab 3 (ритуксан) во временные точки, для которых проводили измерения. Уровни Т-клеток возвращались к базовому уровню в группах биспецифических антител на 4 день и оставались на базовом уровне до окончания эксперимента (См. Фигуру 11B).

[00311] *In vivo* эффективность CD3хCD20 биспецифических антител – антитела 1 и антитела 4 – определяли в периферической крови яванских макаков в продолжительном исследовании (3 месяца), измеряя изменение в уровнях В-клеток CD20+ или Т-клеток CD3+ аналогично с исследованием, описанным выше. Плацебо (базовый раствор) или биспецифические антитела вводили при 1,0 мг/кг на день 0. Уровни В-клеток в периферической крови были существенно снижены на 2 день в обеих группах биспецифических антител и оставались сниженными в течение всего исследования во всех образцах за исключением плацебо (См. Фиг. 12А). Временное снижение числа Т-клеток наблюдали на 2 день в биспецифических группах, затем Т-клетки восстанавливались до базового уровня на 4 день и оставались приблизительно на базовом уровне в течение всего исследования (> 80 дней) у животных, обработанных биспецифическими антителами (Фиг. 12В). Снижение числа Т-клеток не наблюдали у животных, обработанных плацебо.

[00312] Чтобы дополнительно оценить *in vivo* CD3хCD20 биспецифических антитела 1 и антитела 4 при введении низких доз, определяли изменение в уровнях В-клеток CD20+ или Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков в продолжительном исследовании (2 месяца), аналогично с вышеописанными экспериментами. Биспецифические антитела вводили при 0,01 мг/кг или 0,001 мг/кг (1 мкг/кг) на день 0. Уровни В-клеток в периферической крови были существенно снижены на 2 день и оставались сниженными в течение всего исследования для обеих групп CD3хCD20 (Фиг. 13А), что сходно с картиной, наблюдаемой для животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (как видно из Таблицы 17 и на Фигурах 11А или 12А). Животные, обработанные очень низкими дозами (1 мкг/кг) биспецифических антител демонстрировали такое же временное снижение числа Т-клеток и восстановление, которое наблюдали у животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (См. Фиг. 13В по сравнению с Фигурами 11В или 12В).

[00313] Наблюдаемое в описанных исследованиях снижение числа В-клеток коррелировало со снижением уровней циркулирующих антител в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc антителом 1 (См. Фигуру 14). Так как наличие антител в системе циркуляции животных снижалось со временем, популяция В-клеток начинала восстанавливаться (например, как наблюдали на 81 день у животного № I06881).

[00314] Корреляцию снижения числа В-клеток со снижением числа циркулирующих антител в периферической крови также наблюдали у животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc антителом 2 (См. Фигуру 15), когда наличие антител в системе циркуляции животных снижалось со временем, популяция В-клеток начинала

восстанавливаться, например, как наблюдали на 66 день у животного № I06876 и на 68 день у животного № I06877. Сходную корреляцию также наблюдали у животных, обработанных CD3хCD20-дт Fc (Ab 4) биспецифическим антителом (См. Фигуру 16). Так как наличие антител в системе циркуляции животных снижалось со временем, популяция В-клеток начинала восстанавливаться (См. Фигуру 16, например, как наблюдали на 91 день у животного № I06870 и на 64 день у животного № I06872).

Пример 11. CD3 х CD20 биспецифические антитела могут снижать число В-клеток CD20+ в лимфоидных тканях яванских макаков при более низких дозах, чем моноспецифическое антитело

[00315] Методом FACS исследовали изменения в уровнях В-клеток CD20+ в лимфоидных тканях яванских макаков после введения анти-CD3хCD20 биспецифического антитела (антитела 1 или антитела 4) по сравнению с моноспецифическим анти-CD20 антителом (контрольное Ab 3 – ритуксан). Исследование проводили на самцах яванских макаков (*Macaca fascicularis*), разделенных на 8 групп дозирования по 3 животных на группу дозирования, аналогично с Группами 1-8, описанными выше в Примере 10. Дозы препаратов антител или базового раствора вводили путем в.в. инфузии, а животных умерщвляли и собирали ткани через 7 дней после дозирования. Образцы тканей анализировали методом FACS в отношении белых кровяных телец (CD45+) и, в частности, маркеров В-клеток (CD20+), затем определяли % объема В-клеток.

[00316] Популяции В-клеток определяли при помощи релевантных флуоресцентно меченых антител (CD20 APC-Cy7) и получения данных FACS, аналогичным способом, описанным выше в Примере 10. Результаты показаны в Таблице 18 и на Фигурах 17А и 17В.

Таблица 18: Процент CD20-положительных клеток в мезентеральных лимфатических узлах и селезенке после обработки

		Мезентеральные лимфатические узлы	Селезенка
Обработка	Животное, ID №	День 7	День 7
Плацебо	78	38,14	63,22
	79	38,57	62,79
	80	37,36	49,17
Контрольное Ab 3 30 мг/кг	81	6,21	4,5
	82	10,3	3,45
	83	4,21	2,18
Ab 4 0,01 мг/кг	84	13,43	3,14
	85	6,88	2,27
	86	10,78	1,39
Ab 4 0,1 мг/кг	87	1,51	2,37
	88	0,45	1,65

	89	1,24	2,4
Ab 4	90	0,63	0,97
1 мг/кг	91	0,62	1,93
	92	1,08	1,22
Ab 1	93	5,38	1,22
0,01 мг/кг	94	6,37	1,89
	95	13,25	6,99
Ab 1	96	0,43	1,55
0,1 мг/кг	97	0,68	1,75
	98	2,36	2,97
Ab 1	99	0,33	1,79
1 мг/кг	00	1,6	1,71
	01	0,5	1,21

[00317] Как показано в Таблице 18 и на Фигуре 17А, введение CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом приводило к снижению числа тканевых В-клеток в селезенке при намного более низких дозах (дозы от 0,01 до 1,0 мг/кг) в биспецифических группах. Такое снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных.

[00318] Как показано в Таблице 18 и на Фигуре 17В, введение CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом приводило к снижению числа тканевых В-клеток в мезентеральных лимфатических узлах при намного более низких дозах (дозы от 0,01 до 1,0 мг/кг) в биспецифических группах, при этом дозы биспецифического антитела 0,1 мг/кг и 1 мг/кг приводили к более эффективному снижению числа В-клеток, чем наблюдаемое в моноспецифической группе. Такое снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных. После иммуногистохимического окрашивания CD20 (данные не показаны), регистрировали остаточные В-клетки в лимфатических узлах моноспецифически (Ритуксан®, 30мг/кг) обработанной группы. В тканях, собранных в группах, обработанных дозами от 0,1 до 1,0 мг/кг биспецифического анти-CD3хCD20 антитела, не регистрировали остаточные В-клетки. Эти данные демонстрируют, что Ab1 и Ab1 характеризуются степенью уничтожения В-клеток, большей чем Ab3.

Пример 12. Обработка опухолей CD3 х CD20 биспецифическим антителом

А. Обработка CD20 х CD3 биспецифическим антителом подавляет рост опухолей Raji у мышей NSG

[00319] Чтобы оценить эффективность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител в снижении роста опухолей Raji, мышам NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2R^{γnull}), приобретенным у Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), подкожно коимплантировали 2×10^6 опухолевых клеток Raji и 5×10^5 человеческих МКПК (День 0). В

тот же день мышей обрабатывали внутрибрюшинной дозой, составляющей 0,4, 0,04 или 0,004 мг/кг на мышь (N = 5 мышей на группу обработки) антитела 1 или контрольного антитела 5 (IgG1-антитело против нерелевантной мишени), или контрольного базового раствора. Начиная с Дня 0, мышей обрабатывали дважды в неделю внутрибрюшинной дозой лекарственного препарата или базового раствора до конца исследования. Размер опухолей измеряли два раза в неделю при помощи калиперов, а объем опухолей рассчитывали как: $\text{Объем} = (\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$. Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 (Macintosh Version).

[00320] Статистическую значимость определяли при помощи двухфакторного анализа ANOVA с применением критерия множественных сравнений Тьюки. Данные по каждой выборке сравнивали для групп обработки. Статистически значимым считали пороговое значение $p < 0,05$.

Результаты показаны на Фигурах 7A-7F. Эти результаты показывают, что антитело 1 (CD3xCD20-химерный Fc) нацелено на опухоли Raji у мышей, которым совместно имплантировали человеческие иммунные клетки, что приводит к полному подавлению роста опухолей при исследуемых дозах (ФИГ. 7C: 0,4 мг/кг Ab1; ФИГ. 7E: 0,04 мг/кг Ab1; ФИГ. 7F: 0,004 мг/кг Ab1). Этот пример демонстрирует, что обработка CD3xCD20 биспецифическим антителом 1 была эффективной в отношении ингибирования роста опухолей, начиная со времени имплантации опухолей. Полное подавление роста опухолей Raji сохранялось вплоть до 23 дней после имплантации у мышей, которым вводили 0,4, 0,04 или 0,004 мг/кг антитела 1, по сравнению с контролем. Также наблюдали, что ни антитело 1, ни контрольное антитело не оказывали существенное влияние на массу тела мышей во время исследования (данные не показаны).

[00321] Противоопухолевое действие CD3xCD20 биспецифических антител дополнительно исследовали на сходной мышинной модели NSG (как описано выше), при этом каждую мышь NSG дозировали 1 мг мышинного IgG (mIgG2a Fc) на День -1 и один раз в неделю после этого. Результаты показаны на Фигурах 8A- 8B.

[00322] Этот эксперимент демонстрирует, что обработка CD3xCD20 биспецифическим антителом 1 (CD3xCD20-химерный Fc) или CD3xCD20 биспецифическим антителом 4 (CD3xCD20-дт Fc) была эффективной в отношении ингибирования роста опухолей, начиная со времени имплантации опухолей при исследуемых дозах биспецифического Ab в присутствии циркулирующего IgG (Фигуры 8A-8B). Как видно на Фиг. 8A, антитело 1 (CD3xCD20-химерный Fc биспецифическое антитело) демонстрировало полное подавление роста опухолей в течение исследуемого периода без добавки IgG в этом эксперименте.

В. Обработка CD20 x CD3 биспецифическим антителом уменьшает размер развившихся опухолей у мышей NSG Mice

[00323] Оценивали эффективность отобранных анти-CD3xCD20 биспецифических антител в уменьшении размеров развившихся опухолей у мышей NSG. Мышей NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2R γ^{null}) приобретали у Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) и подкожно коимплантировали HLA-совместимые опухолевые клетки Raji (2×10^6) и человеческие МКПК (5×10^5) (День -15). Перед началом обработки опухолям позволяли развиваться в организме хозяев в течение 15 дней. За один день до введения лекарственного препарата (День -1) каждую мышь добавочно дозировали 5 мг mIgG2a Fc. Мышей подкожно дозировали mIgG2a Fc в дозе 5 мг на мышь один раз в неделю в течение эксперимента (День 7, День 14 и т.д.). Перед введением лекарственного препарата мышей разделяли на 2 экспериментальные группы в соответствии с размером опухолей: Группа 1: $\sim 200\text{--}400 \text{ мм}^3$ или Группа 2: $\sim 500\text{--}900 \text{ мм}^3$.

[00324] После обработки лекарственным препаратом для каждой мыши отслеживали и записывали размер опухоли на 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21 и 28 день. Размер опухолей измеряли два раза в неделю при помощи калиперов, а объем опухолей рассчитывали как: Объем = (длина x ширина²)/2. Наличие опухолей также определяли путем пальпации. Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 (Macintosh Version). Данные по каждой выборке сравнивали для групп обработки. Результаты показаны на Фигурах 9 и 10.

а. Группа 1: $\sim 200\text{--}400 \text{ мм}^3$ опухоли. Начиная с Дня 0, несколько групп по 4 и 5 мышей в каждой обрабатывали указанной дозой лекарственного препарата или базового раствора один раз в неделю (т.е. День 7, День 14 и т.д.) следующим образом:

- i. Контроль: только базовый раствор
- ii. Контрольное антитело 5, 0,4 мг/кг
- iii. Антитело 1 (CD20xCD3-химерный Fc), 0,4 мг/кг

б. Группа 2: $\sim 500\text{--}900 \text{ мм}^3$ опухоли. Начиная с Дня 0, несколько групп по 4 мыши в каждой обрабатывали указанной дозой лекарственного препарата один раз в неделю (т.е. День 7, День 14 и т.д.) следующим образом:

- i. Контрольное антитело 5, 0,4 мг/кг
- ii. Антитело 1 (CD20xCD3-химерный Fc), 0,4 мг/кг

[00325] Опухоли полностью регрессировали в группе, которой вводили 0,4 мг/кг антитела 1 (CD20xCD3-химерный Fc) через 14 дней. См. Фигуру 9.

[00326] В модели с более крупными развившимися опухолями (т.е. Группа 2, $\sim 500\text{--}900 \text{ мм}^3$) обработка антителом 1 (CD20xCD3-химерный Fc) (0,4 мг/кг) приводила к полной абляции наблюдаемых опухолей у мышей через 21 день. См. Фигуру 10, которая

демонстрирует эффективность Ab1 в лечении мышей с объемными лимфомными массами (т.е. опухолями, положительными в отношении экспрессии CD20), превышающими 0,5 см и до 0,9 см в объеме.

Пример 13. CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию МКПК *in vitro*

[00327] Оценивали способность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител и контрольных конструкций стимулировать мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и индуцировать пролиферацию, используя АТР-катализируемый количественный анализ (CellTiter Glo®). Активация МКПК приводит к высвобождению цитокинов, которые стимулируют клеточную пролиферацию.

[00328] Данные по пролиферации получали, используя следующий протокол: Полученные от человека или яванского макака МКПК (5×10^5 /лунку) инкубировали с серийными разведениями CD3хCD20 биспецифических антител или контрольного антитела и коммерческого анти-CD28 антитела (челов.: 200 нг/мл, яв. макака: 500 нг/мл) в течение 72 часов при 37°C. Количественную оценку клеток проводили, используя Cell Titer Glo®, а люминесценцию, как данные по жизнеспособности клеток, измеряли при помощи мультиметочного планшет-ридера VICTOR X5 (PerkinElmer), чтобы выявить живые клетки. Жизнеспособность клеток (соотношение индукции стимулированных и нестимулированных клеток) определяли, разделив данные по люминесценции для стимулированных клеток на базовую люминесценцию для нестимулированных клеток, и строили график при помощи программного обеспечения Prism. Результаты обобщены в Таблице 19 и на Фигурах 18А и 18В.

Таблица 19. EC₅₀ для пролиферации МКПК человека или яванского макака, индуцированной анти-CD3х CD20 биспецифическими антителами

Антитело	EC ₅₀ [М] для пролиферации МКПК человека	EC ₅₀ [М] для пролиферации МКПК яванского макака
Контрольное Ab 5	НА	НА
CD3хCD20-дт Fc (Ab 4)	8,427E-12	3,325E-11
Антитело 1	1,163E-10	1,275E-11

Данные представляют медианные величины по 3 или более независимым анализам. НА = нет активности.

[00329] Как показано в Таблице 19 и на Фигурах 18А-18В, оба CD20 х CD3 биспецифических антитела согласно изобретению индуцировали пролиферацию МКПК человека или яванского макака. Антитело 1 индуцировало пролиферацию МКПК человека или яванского макака с приблизительно одинаковой эффективностью. Контрольное Ab 5 не проявляло активности.

Пример 14. CD20 x CD3 биспецифические антитела опосредуют уничтожение клеток активированными Т-клетками *in vitro*

[00330] МКПК человека или яванского макака выделяли при помощи Ficoll-Paque или используя среду для разделения клеток Lympholyte Mammal, соответственно. Выделенные МКПК (1×10^6 клеток/мл МКПК человека или 5×10^6 клеток/мл МКПК яванского макака) активировали в течение 7 и 21 дня, соответственно, в полной среде (RPMI, дополненная 10 % ФБС, 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 292 мкг/мл L-глутамин), содержащей рекомбинантный человеческий IL-2 (30 Е/мл для МКПК человека, 100 Е/мл для МКПК яванского макака) и активационные Т-клеточные гранулы (анти-CD3/CD28 для МКПК человека, анти-CD2/CD3/CD28 для МКПК яванского макака). CD20-экспрессирующие клетки Raji (2×10^6 клеток/мл) метили 8 мкМ кальцеина-АМ в течение 30 минут при 37 °С и 3 раза промывали средой. Меченые кальцеином клетки-мишени (10000-20000 клеток/лунку) высевали в 200 мкл с активированными Т-клетками (соотношение эффекторных клеток/клетки-мишени 10:1) и серийными разведениями антитела 1, Ab 4 или контрольного Ab 5 (диапазон концентраций для человека: от 2 нМ до 0,00003 нМ; диапазон концентраций для яванского макака: от 6,6 нМ до 0,002 пМ) в полную среду в течение 2 часов при 37°С. После инкубации планшеты центрифугировали, а супернатанты переносили в светопроницаемый черный планшет с прозрачным дном для флуоресцентного анализа. Процент цитотоксичности рассчитывали, используя уравнение:

[00331] $\% \text{ цитотоксичности} = ((FS - FSR)/(FMR - FSR)) * 100 \%$,

[00332] где FS – высвобождение кальцеина из исследуемой лунки, FSR – спонтанное высвобождение кальцеина, а FMR – максимальное высвобождение кальцеина из клеток, лизированных Тритоном-Х.

[00333] EC_{50} для жизнеспособности клеток (АТР-катализируемый количественный анализ) определяли при помощи программного обеспечения Prism. Лизис клеток (цитотоксичность) определяли по высвобождению кальцеина как долю максимального высвобождения. Рассчитывали процент клеточной цитотоксичности как отношение наблюдаемого высвобождения к максимальному высвобождению и определяли значения EC_{50} . Результаты показаны в Таблице 20 и на Фигурах 19А (Т-клетки человека) и 19В (Т-клетки обезьян).

Таблица 20. Значения EC_{50} для CD3xCD20-индуцированной цитотоксичности в отношении клеток Raji

Антитело	Индукцированная активированными человеческими Т-клетками цитотоксичность Raji [M]	Индукцированная активированными обезьяньими Т-клетками цитотоксичность Raji [M]
Контрольное Ab 5	НА	НИ
CD3xCD20-дт Fc (Ab	1,571 E-11	1,730E-12

4)		
Антитело 1	2,503E-11	9,104E-12

HA = нет активности; NT = не исследовано.

[00334] Как показано в Таблице 20, антитело 1 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC_{50} , составлявшими 25,0 пМ и 9,1 пМ для Т-клеток человека (Фигура 19А) и яванского макака (Figure 19В), соответственно. Антитело 4 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC_{50} , составлявшими 15,7 пМ и 1,73 пМ для Т-клеток человека (Фигура 19А) и яванского макака (Figure 19В), соответственно. Для контрольного антитела активность не наблюдали.

[00335] Чтобы отследить специфическое уничтожение CD20-несущих клеток-мишеней методом проточной цитометрии, родительские клетки мышинной миеломы B16F10.9 (которые не экспрессируют CD20) и клетки B16F10.9, сконструированные так, чтобы стабильно экспрессировать человеческий CD20 (B16F10.9/CD20), метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфира (CFDA-SE) и Violet Cell Tracker, соответственно. После мечения клетки смешивали в соотношении 1:1 и высевали на ночь при 37 °С. Отдельно высевали человеческие МКПК в дополненную среду RPMI при 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37 °С, чтобы обогатить в отношении лимфоцитов путем снижения числа адгезивных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с адгезивными бесклеточными наивными МКПК (соотношение эффекторные клетки/клетки мишени 4:1) и серийными разведениями исследуемых CD3хCD20 биспецифических антител или IgG1 контрольного антитела 5 (диапазон концентраций: от 66,7 нМ до 0,25 пМ) в течение 48 часов при 37 °С. Клетки удаляли из клеточных культуральных планшетов при помощи не содержащего ферменты буфера для диссоциации клеток и анализировали методом FACS. Для анализа FACS клетки окрашивали живым/неживым дальнекрасным клеточным трекером (Invitrogen). Для оценки специфичности уничтожения проводили гейтинг клеток на живых меченых Violet и CFDA-SE популяциях. Процент каждой популяции использовали для расчета приведенного значения выживаемости следующим образом: Приведенное значение выживаемости = $(R1/R2) \times 100$, где $R1 = [(B16F10.9/CD20) / \text{посторонние клетки (B16F10.9)}] \times 100$ в отсутствие антитела, а $R2 =$ то же соотношение, но в присутствии антитела.

Таблица 21. Значения EC_{50} для мишень-специфического уничтожения в клетках B16F10.9/CD20

Антитело	% выживших клеток B16F10.9/CD20 [M]
Контрольное Ab 5	HA

CD3xCD20-дт Fc (Ab 4)	1,282E-11
Антитело 1	1,952E-11

НА = нет активности.

[00336] Как CD3xCD20-химерный Fc (антитело 1), так и CD3xCD20-дт Fc (антитело 4) специфическим образом направляли человеческие Т-клетки для уничтожения только клеток-мишеней, экспрессирующих CD20 (Фигуры 20А-В) в смешанной популяции клеток. Уничтожение клеток-мишеней наблюдали только в присутствии биспецифического антитела с дозозависимым снижением числа клеток B16F10.9/CD20 вследствие действия антитела 1 (EC₅₀ 19,5 пМ) и антитела 4 (EC₅₀ 12,8 нМ) (Фигура 20В). Менее 5 % CD20-экспрессирующих клеток оставалось живыми при наибольшей исследуемой дозе (10 мкг/мл) (Фигура 20В). Никаких признаков гибели клеток не наблюдали в популяции родительских клеток B16F10.9 или в популяции B16F10.9/CD20 с контрольным Ab 5, контрольным антителом IgG1.

Пример 15. CD3xCD20 биспецифическое антитело характеризуется повышающей регуляцией ранних маркеров активации CD69 на Т-клетках в 20-часовом *in vitro* анализе FACS

[00337] CD69⁺ является одним из наиболее ранних индуцибельных маркеров клеточной поверхности, свидетельствующих об активации Т-клеток. Активацию Т-клеток можно определить, исследуя повышающую регуляцию специфических маркеров клеточной поверхности, таких как CD69.

[00338] Способность CD3xCD20 биспецифического антитела к повышающей регуляции раннего маркера активации CD69 на Т-клетках человека или яванского макака в цельной крови определяли в 20-часовом *in vitro* анализе FACS. Вкратце, активацию Т-клеток оценивали, инкубируя свежеполученную цельную кровь человека или яванского макака (100 мкл) в 96-луночных планшетах с плоским дном с 5-кратными (человек) или 10-кратными (яванский макак) серийными разведениями антитела 1, антитела 4 или контрольного Ab 5 (диапазон концентраций от 50 нМ до 0,0006 нМ) в RPMI+L-глутамат в конечном объеме 200 мкл в течение 20 часов при 37 °С. После инкубации планшеты центрифугировали в течении 5 минут при 1000 об/мин и удаляли плазму. Чтобы определить наличие повышающей регуляции CD69 на Т-клетках, фенотипирующий коктейль, содержащий напрямую конъюгированные антитела к CD2 и CD69, а также CD45, CD4, CD8 и либо CD19 (человек), либо CD16 (яванский макак) добавляли непосредственно в кровь на 30 минут при 4 °С. Красные кровяные тельца лизировали в течение 15 минут в 1,5 мл буфера PharmLyse, следуя инструкциям производителя. Клетки дважды промывали, пересуспендировали в 200 мкл охлажденного ФСБ + 1 % ФБС и

анализировали методом проточной цитометрии, используя цитометр BD FACSCanto. Т-клетки CD4⁺ выявляли, проводя сначала гейтинг на жизнеспособных малых лимфоцитах CD45⁺, а затем гейтинг на Т-клетках CD19⁻/CD2⁺/CD4⁺ (человек) или Т-клетках CD16⁻/CD2⁺/CD4⁺ (яванский макак).

[00339] Представлена процентная доля активированных Т-клеток (CD69⁺) из общего числа эффекторных клеток CD2⁺. См. Таблицу 22, а также Фигуру 21. Результаты показывают, что CD3хCD20 биспецифические антитела в значительной степени активируют Т-клетки, о чем свидетельствует наличие раннего маркера активации CD69.

Table 22. Значения EC₅₀ для мишень-специфического уничтожения в клетках B16F10.9/CD20

Антитело	% активированных Т-клеток (CD69 ⁺) [M]
Контрольное Ab 5	HA
CD3хCD20-дт Fc (Ab 4)	7,907E-11
CD3хCD20-химерный Fc (антитело 1)	1,560E-11

HA = нет активности.

Пример 16. CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями

[00340] Формат кластеризации клеток использовали, чтобы определить, что CD3хCD20 биспецифическое антитело связывает Т-клетки с клетками-мишенями (клетками CD20⁺) посредством своих биспецифических связывающих плеч. Эффекторные клетки предварительно окрашивали CFSE, а клетки CD20⁺ предварительно окрашивали Violet Cell Tracker в течение 24 часов и проводили гейтинг на отдельных квадрантах после инкубации с нерелевантным контрольным антителом (контрольное антитело 5, нерелевантное антитело изотипа IgG1). См. Фигуру 22А, которая отображает отсутствие кластеризации (двойное окрашивание) в клеточной смеси в случае обработки нерелевантным антителом. После инкубации с CD3хCD20 биспецифическим антителом проявлялись клеточные кластеры, так как они окрашены как CFSE, так и Violet (См. Фигуру 22В, верхний левый квадрант на графике разброса, участок, выделенный жирным квадратом).

Пример 17. Экспрессия ингибиторных маркеров Tim-3 и PD-1 на клетках CD3⁺

[00341] В несущих опухоли организмах-хозяевах возникает нарушение функционирования или истощение Т-клеток. Рецепторы Tim-3 и PD-1 были определены как маркеры истощения Т-клеток при хронических болезненных состояниях. Согласно исследователям Sakuishi, K. et al. (*J. Exp. Med.* 207(10):2187-2194, 2010), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), положительные в отношении Tim-3 и PD-1 (Tim-3+PD-1+TIL),

соответствуют наиболее тяжелому истощенному фенотипу, определяемому по неспособности пролиферировать и вырабатывать IL-2, TNF и IFN- γ .

[00342] CD3-положительные клетки выделяли из крови и опухолей мышей NSG, которым подкожно коимплантировали HLA-совместимые опухолевые клетки Raji и человеческие МКПК – См. Пример 12B, выше. Вкратце, перед началом обработки опухолям позволяли развиваться в организме хозяев в течение 15 дней, затем мышей разделяли на две группы обработки в соответствии с размером опухолей (См. Пример 12B). Кровь брали у обработанных (биспецифическое Ab) и необработанных мышей на 9 день в каждой исследуемой группе, т.е. Группе 1, ~200-400 мм³ или Группе 2, ~500-900 мм³. Необработанных мышей (базовый раствор или контрольное Ab), имевших опухоли, достигшие 1500 мм³, умерщвляли в конце исследования, а эти опухоли исследовали в отношении экспрессии PD1 и Tim-3.

[00343] Для экспериментов с циркулирующими Т-клетками отбирали фракции жизнеспособных Т-клеток CD45+CD3+ для определения маркеров, используя напрямую меченые антитела к Tim-3 или PD-1 (доступные на коммерческой основе от Biolegend). Клетки Tim-3+PD-1+ составляли основную фракцию циркулирующих Т-клеток в крови необработанных животных. При этом Т-клетки в крови обработанных CD20хCD3 биспецифическим антителом (Ab 1) животных демонстрировали меньшие фракции клеток Tim-3+PD-1+.

[00344] Опухолевые клетки от необработанных мышей-хозяев отделяли и окрашивали в отношении жизнеспособности. Анализ FACS проводили для жизнеспособных отдельных клеток, чтобы отсортировать фракции клеток CD45+CD3+, которые исследовали в отношении экспрессии Tim-3 или PD-1.

[00345] Мы обнаружили, что ингибиторные рецепторы Tim-3 и PD-1 экспрессировались на CD3+ TIL в В-клеточных лимфомах NSG необработанных мышей во время экспериментов, описанных в Примере 12B, а клетки Tim-3+PD-1+ составляли основную фракцию Т-клеток, инфильтрирующих опухоли.

Пример 18. Обработка CD3 x CD20 биспецифическим антителом является более эффективной чем анти-CD20+ антителом у мышей NSG с развившимися опухолями Raji

[00346] Оценивали эффективность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител в уменьшении размеров опухолей у мышей NSG. Мышам NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2R γ null; Jackson Laboratories) подкожно коимплантировали опухолевые клетки Raji (2х10⁶) и человеческие МКПК (5х10⁵) (День -14) (аналогично с Примером 12B, выше).

[00347] CD20хCD3 биспецифическое Ab1 (дозированное при 0,4 мг/кг; 2х/неделю, в.б.)

было сопоставимо с CD19хCD3 BiTE (дозированным при 0,5 мг/кг; 5х/неделю, в.в.) (Фигура 23) и превосходило терапию ритуксимабом (дозированным при 8 мг/кг; 5х/неделю, в.б.) (Фигура 24) в подавлении развившихся опухолей Raji, тем самым демонстрируя, что Ab1 было эффективным при лечении млекопитающих с крупными лимфомными массами, превышающими объем в 0,5 см.

Пример 19. Обработка CD20+ меланомы CD3 х CD20 биспецифическим антителом

[00348] Исследователи определили, что некоторые субпопуляции меланомного рака у пациентов, например CD20+ опухолевые клетки меланомы, могут иметь опухоль-инициирующие характеристики и повышенный риск повторного появления заболевания (Pinc et al. *Mol Ther.* 20(5):1056-1062, 2012, epub 2012 Feb 21). CD20хCD3 биспецифическое антитело Ab1 продемонстрировало потенциальную активность против опухолевых клеток B16F10.9, экспрессирующих CD20, так как оно существенно замедляло рост опухолей hCD20-трансдуцированных B16F10.9 (B16F10.9/CD20) у иммунокомпетентных мышей.

[00349] Мышей, гуманизированных в отношении CD3 (мыши с гуманизированным CD3 $\gamma\epsilon$), гуманизировали в локусе CD20 так, чтобы мыши экспрессировали оба гуманизированных белка. Гуманизированным CD3/CD20 мышам подкожно имплантировали 2×10^5 опухолевых клеток меланомы B16F10.9 (K. Peters/Charles Lin; Duke University), трансдуцированных человеческим CD20. Начиная с Дня 0 (день трансплантации опухолей) мышей 2 раза в неделю внутрибрюшинно обрабатывали базовым раствором (ФСБ; n = 5), 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (контрольное антитело к нерелевантному антигену; n = 5), 0,4 мг/кг Ab1 (N = 5) или 0,004 мг/кг Ab1 (n = 5). Объем опухолей определяли, как указано на Фиг. 25А. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигали объема, превышающего 1500 мм³. Как продемонстрировано на Фиг. 25А, обработка Ab1 замедляла рост опухолей, когда обработку начинали одновременно с трансплантацией опухолей.

[00350] В отдельном эксперименте также исследовали способность Ab1 ингибировать рост опухолей в случае уже развившихся опухолей (Фиг. 25В). Гуманизированным CD3/CD20 мышам подкожно имплантировали 2×10^5 опухолевых клеток меланомы B16F10.9, экспрессирующих человеческий CD20. На 10 день после имплантации опухолей мышей рандомизировали на основании размера опухолей и распределяли по следующим группам обработки, по 5 мышей на группу: базовый раствор (ФСБ), 4 мг/кг контрольного Ab5 (контрольное антитело к нерелевантному антигену), 4 мг/кг Ab1 или 0,4 мг/кг Ab1. Всех мышей обрабатывали в.б. 2 раза в неделю. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигали объема, превышающего 1500 мм³. Как показано на Фиг. 25В, обработка Ab1

замедляла рост опухолей в случае уже развившихся опухолей, демонстрируя, что Ab1 проявляло потенциальную активность против клеток меланомы B16F10.9, экспрессирующих CD20.

[00351] Настоящее изобретение не ограничено объемом конкретных вариантов реализации, описанных в данном документе. В действительности существование различных модификаций изобретения кроме описанных в данном документе станет очевидным для специалистов в данной области техники после изучения вышеприведенного описания и прилагающихся фигур. Такие модификации входят в объем прилагающейся формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерную константную область тяжелой цепи, связанную с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов,

где первый антигенсвязывающий домен (A1), который специфически связывает человеческий CD3, содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), где

- (i) A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
- (ii) A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (iii) A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
- (iv) A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (v) A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и
- (vi) A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24,

где второй антигенсвязывающий домен (A2), который специфически связывает человеческий CD20, содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), где

- (i) A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;
- (iii) A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
- (iv) A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (v) A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и
- (vi) A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24,

где химерная константная область тяжелой содержит:

- (i) аминокислотную последовательность верхней шарнирной области человеческого IgG1 или человеческого IgG4 от позиции 216 до 227 (нумерация EU);
- (ii) аминокислотную последовательность нижней шарнирной области человеческого IgG2 PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) от позиции 228 до 236 (нумерация EU);
- (iii) домен CH1 человеческого IgG1 и домен CH3 человеческого IgG1, или домен CH1 человеческого IgG4 и домен CH3 человеческого IgG4; и
- (iv) аминокислотную последовательность домена CH2 человеческого IgG4 от позиции 237 до 340 (нумерация EU); и

где биспецифическое антитело демонстрирует более высокую аффинность связывания с человеческим FcγRIIA по сравнению с человеческим FcγRIIB, и демонстрирует незначительную или не демонстрирует обнаруживаемой аффинности связывания с человеческим Fc-RIA и человеческим FcγRIII, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса.

2. Биспецифическое антитело по п.1, отличающееся тем, что биспецифическое антитело:

(a) демонстрирует сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности;

(b) демонстрирует незначительную или не демонстрирует выявляемую антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ);

(c) демонстрирует сниженную комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности;

(d) демонстрирует менее чем 50 %-ную цитотоксичность согласно данным по клеточному лизису, полученным в *in vitro* анализе;

(e) демонстрирует незначительную или не демонстрирует выявляемую комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ);

(f) индуцирует снижение опосредованного Т-клетками уничтожения клеток, несущих Fc-рецепторы, таких как НК-клетки или макрофаги, по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа; или

(g) индуцирует снижение уничтожения Т-клеток, опосредованного клетками, несущими Fc-рецепторы, такими как НК-клетки или макрофаги, по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа.

3. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, где биспецифическое антитело содержит:

(a) аминокислотную последовательность химерной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53); или

(b) аминокислотную последовательность химерной шарнирной области ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54).

4. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 10, и аминокислотную

последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 18.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 2, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 18.

6. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит химерный Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит химерный Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит химерный Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит химерный Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ. ID NO: 28.

11. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ. ID NO: 32.

12. Фармацевтическая композиция для лечения или снижения тяжести В-клеточного рака у субъекта, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп. 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где В-клеточный рак представляет собой фолликулярную лимфому.

14. Фармацевтическая композиция по п.12, где В-клеточный рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

15. Фармацевтическая композиция по п.12, в которой В-клеточный рак представляет собой мантийноклеточную лимфому.

16. Фармацевтическая композиция по п.12, где В-клеточный рак представляет собой лимфому маргинальной зоны.

По доверенности

Конструкция химерной шарнирной области

	Верхняя шарнирная область												Нижняя шарнирная область								
IgG1, нумерация EU	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227									
IgG1, нумерация Кабата	226	227	228	232 ^a 229 ^b	233 ^a 230 ^b	234 ^a 232 ^b	235	236	237	238	239	240									
IgG1	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	IgG2	P	C	P	A	P	P	V	A
IgG4	E	S	K	Y	G	--	--	--	P	P	C	P									
IgG4, нумерация EU	216	217	218	219 ^a 219 ^b	220 ^a 220 ^b				224	225	226	227	IgG2, нумерация EU	228	229	230	231	232	233	234	235
IgG4, нумерация Кабата	226	227	228	229	230				237	238	239	240	IgG2, нумерация Кабата	241	242	243	244	245	246	247	248

- означает отсутствие соответствующего номера

-- означает отсутствие соответствующей аминокислоты

^a нумерация в соответствии с последним обновлением IMGT Scientific Chart (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, создан: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.

^b нумерация в соответствии с индексом EU, опубликованная в Kabat, EA, et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)

ФИГ. 1

10	20	30	40	50	60
<u>ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS</u>					
				CH1 Верхн/Нижн шарн. →	CH2 →
70	80	90	100	110	120
<u>GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV</u> <i>EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG</i>					
130	140	150	160	170	180
<u>PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN</u>					
				CH3 →	
190	200	210	220	230	240
<u>STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE</u>					
250	260	270	280	290	300
<u>LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW</u>					
310	320	330			
<u>QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK</u>					

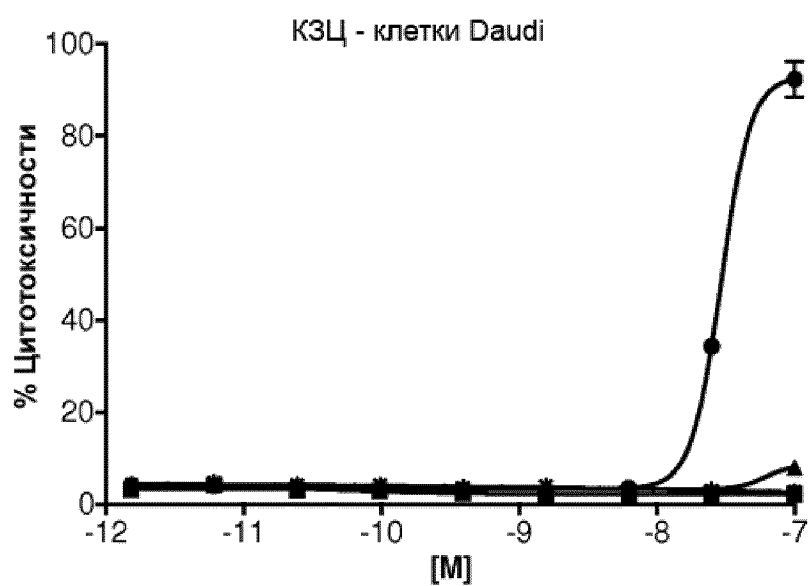
Константная область тяжелой цепи человеческого
IGHG1 UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01857
SEQ ID NO: 45).

10	20	30	40	50	60
<u>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLOSS</u>					
$\leftarrow$CH1 Верхн/Нижн шарн.$\rightarrow$CH2$\rightarrow$					
70	80	90	100	110	120
<u>GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS NTKVDKTV</u> <i>ER KCCVECPPCP APPVAGPSVF</i>					
130	140	150	160	170	180
<u>LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR</u>					
CH3 $\rightarrow$					
190	200	210	220	230	240
<u>VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG</u> QPREPQVYTL PPSREEMTKN					
250	260	270	280	290	300
QVSLTCLVKG FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN					
310	320				
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK					

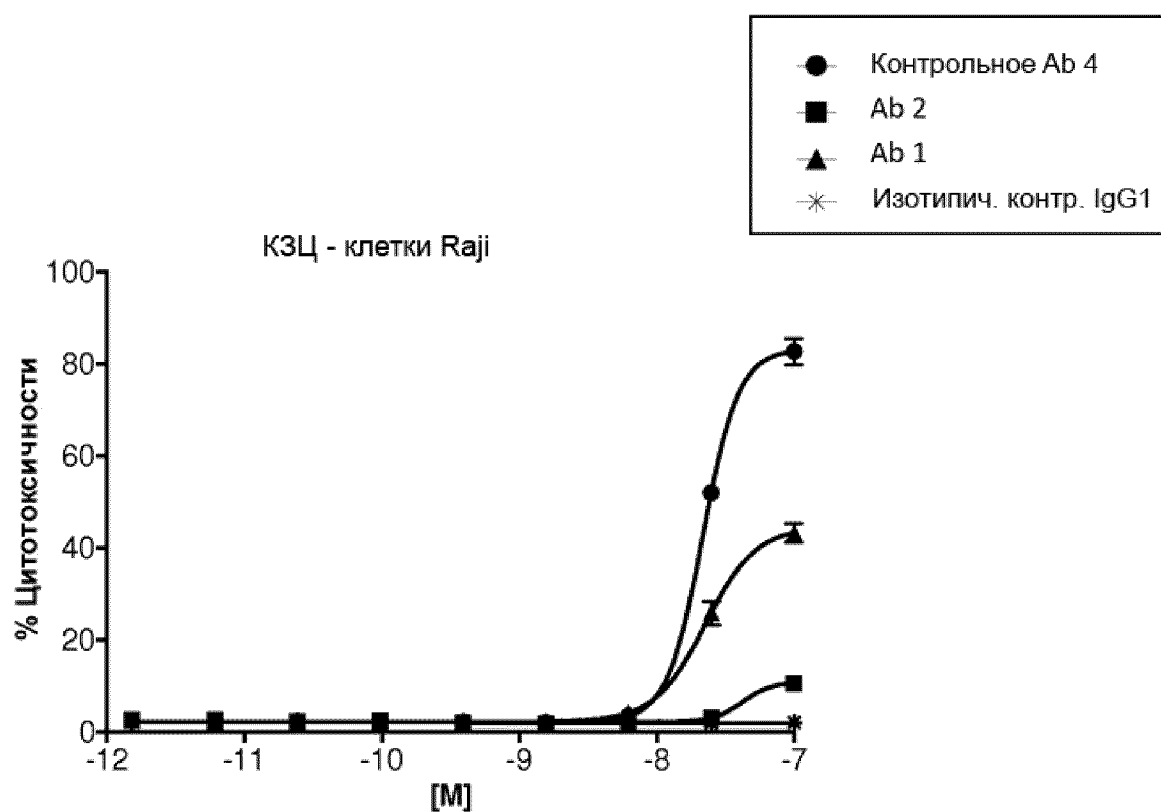
Константная область тяжелой цепи человеческого
 IGHG2 UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01859
 SEQ ID NO: 46) .

10	20	30	40	50	60
<u>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS</u>					
«CH1 Верхн/Нижн шарн.» CH2»					
70	80	90	100	110	120
<u>GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES</u> KYGPPCPSCP APEFLG <u>GPSV</u>					
130	140	150	160	170	180
<u>FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY</u>					
CH3»					
190	200	210	220	230	240
<u>RVSVSLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK</u> GQPREPQVYT LPPSQEEMTK					
250	260	270	280	290	300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG					
310	320				
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK					

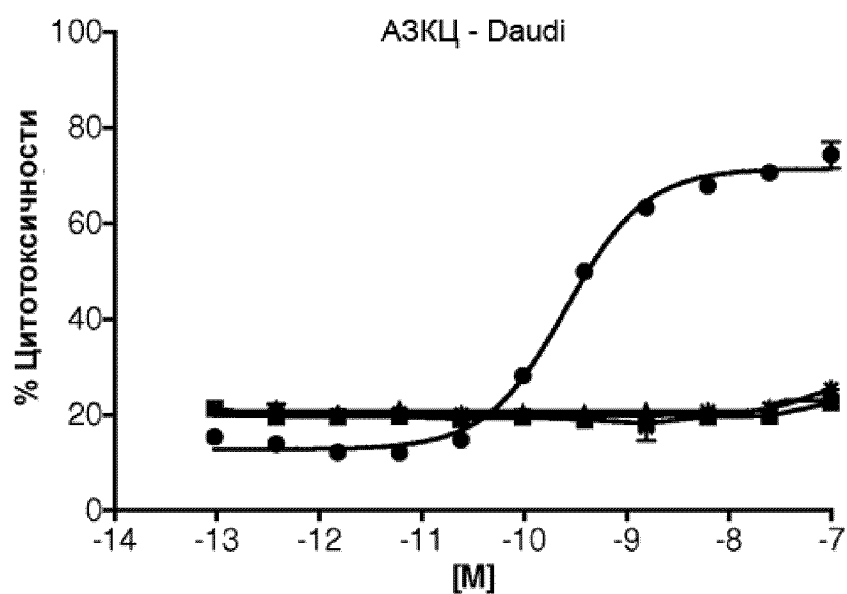
Константная область тяжелой цепи человеческого
IGHG4 UniProtKB/Swiss-Prot, № доступа P01861
SEQ ID NO: 47) .



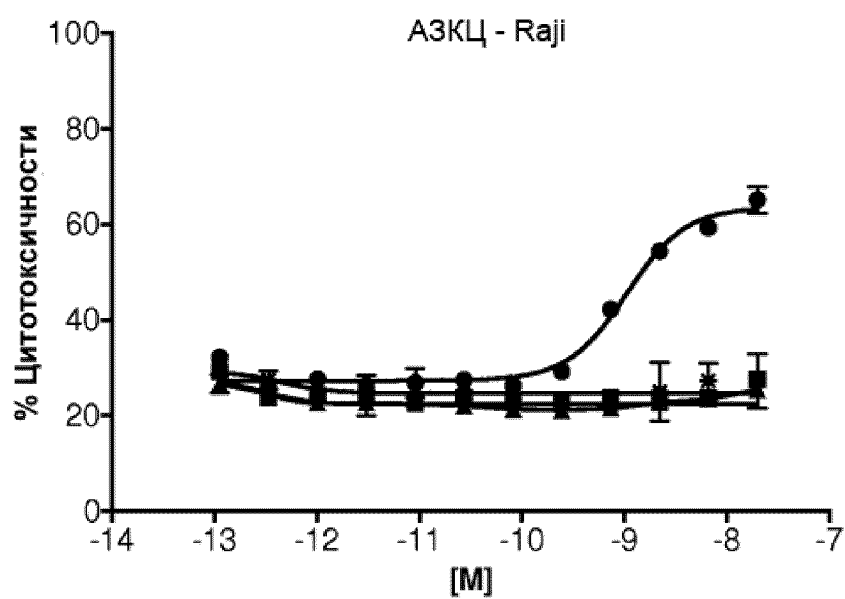
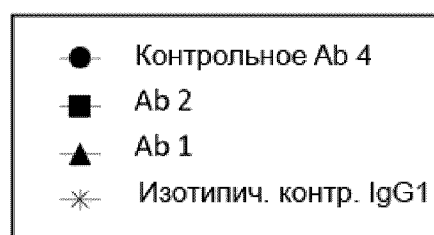
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

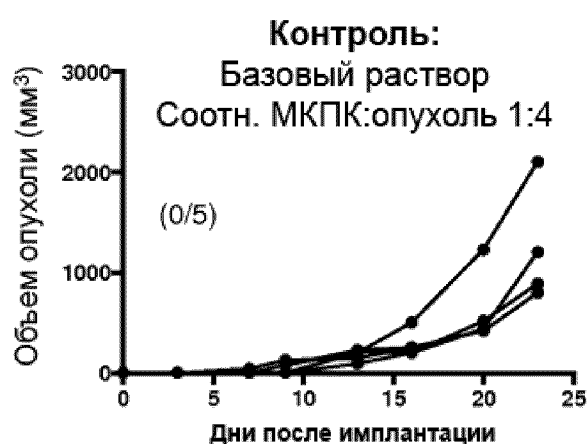


ФИГ. 6А

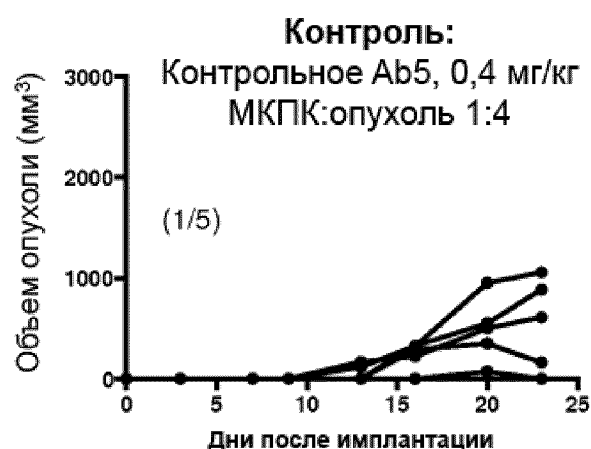


ФИГ. 6В

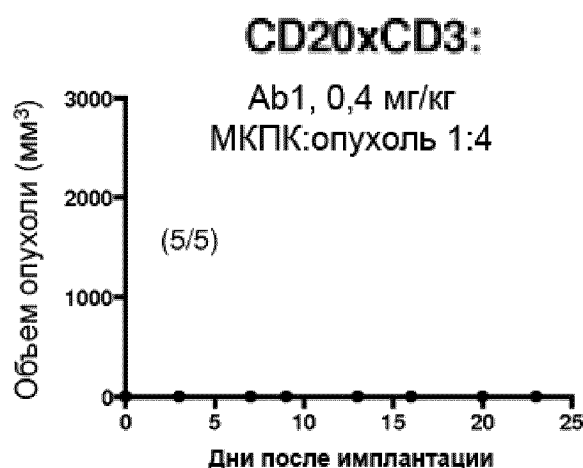
Обработка мышей NSG, которым подкожно имплантировали
опухолевые клетки Raji и МКПК, Ab1 и контрольным препаратом



ФИГ. 7А

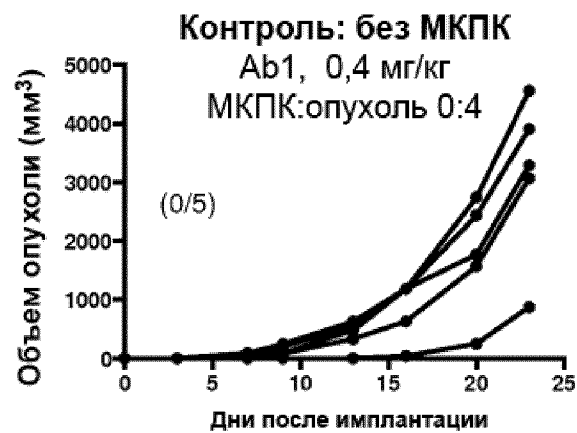


ФИГ. 7В



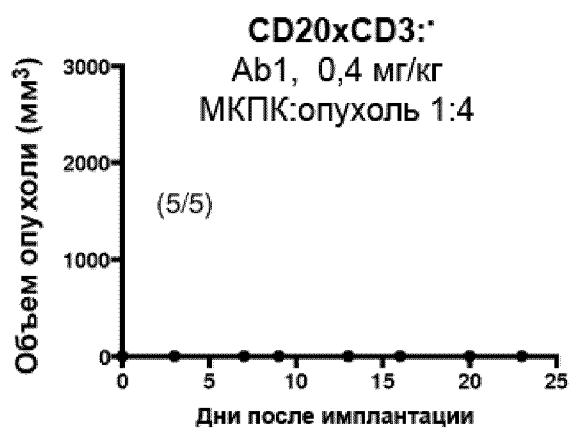
ФИГ. 7С

Контрольная Ab1-обработка мышей NSG, которым подкожно имплантировали опухолевые клетки Raji без МКПК

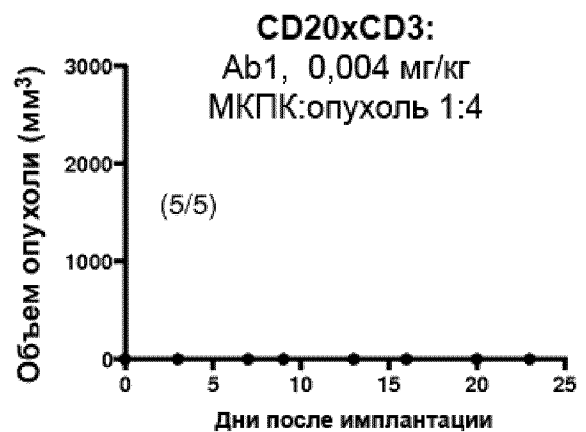


ФИГ. 7D

Ab1-обработка мышей NSG, которым подкожно имплантировали опухолевые клетки Raji и МКПК

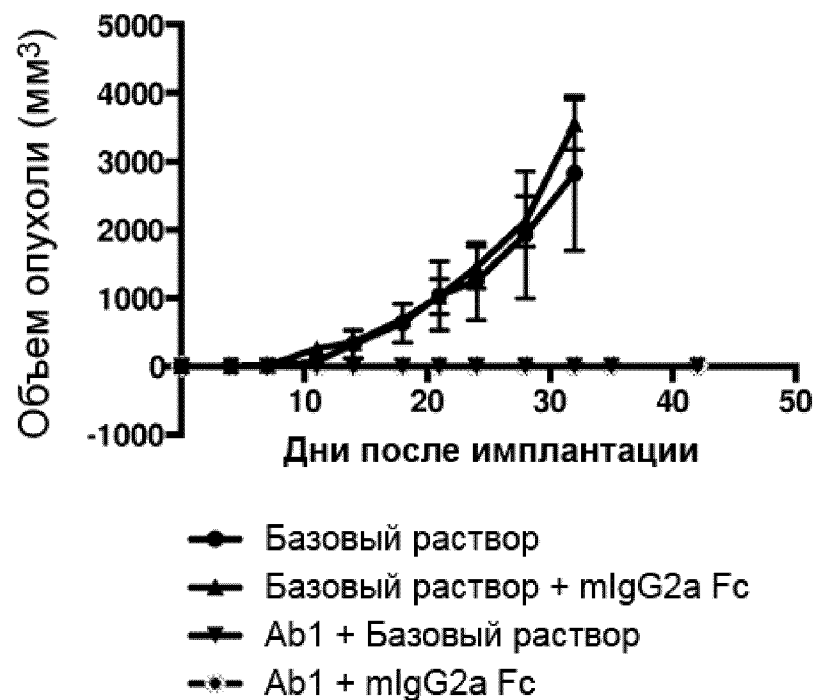


ФИГ. 7E

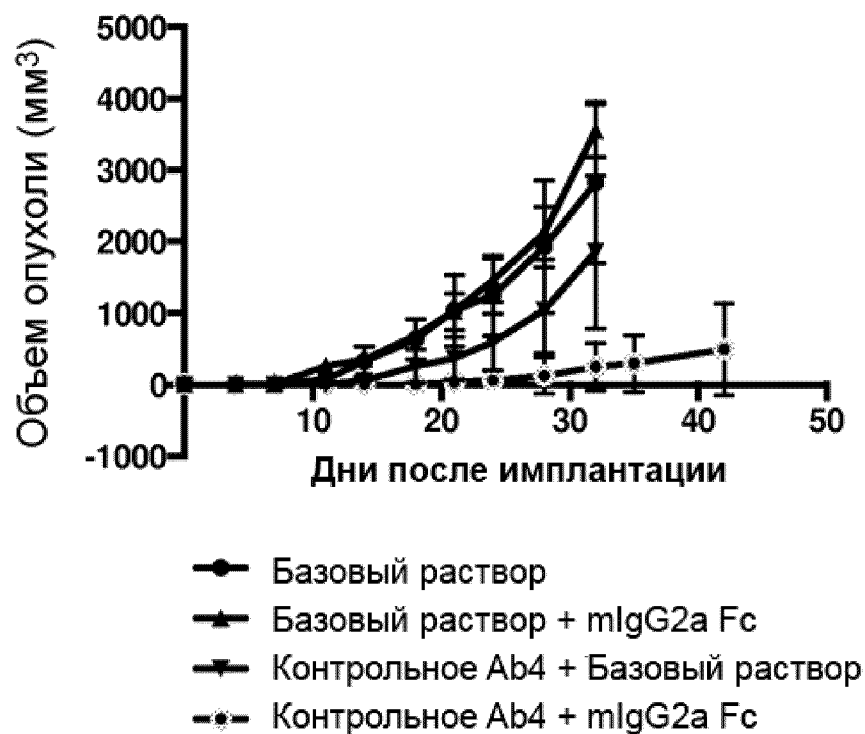


ФИГ. 7F

Мыши NSG с дополненным mlgG2a Fc

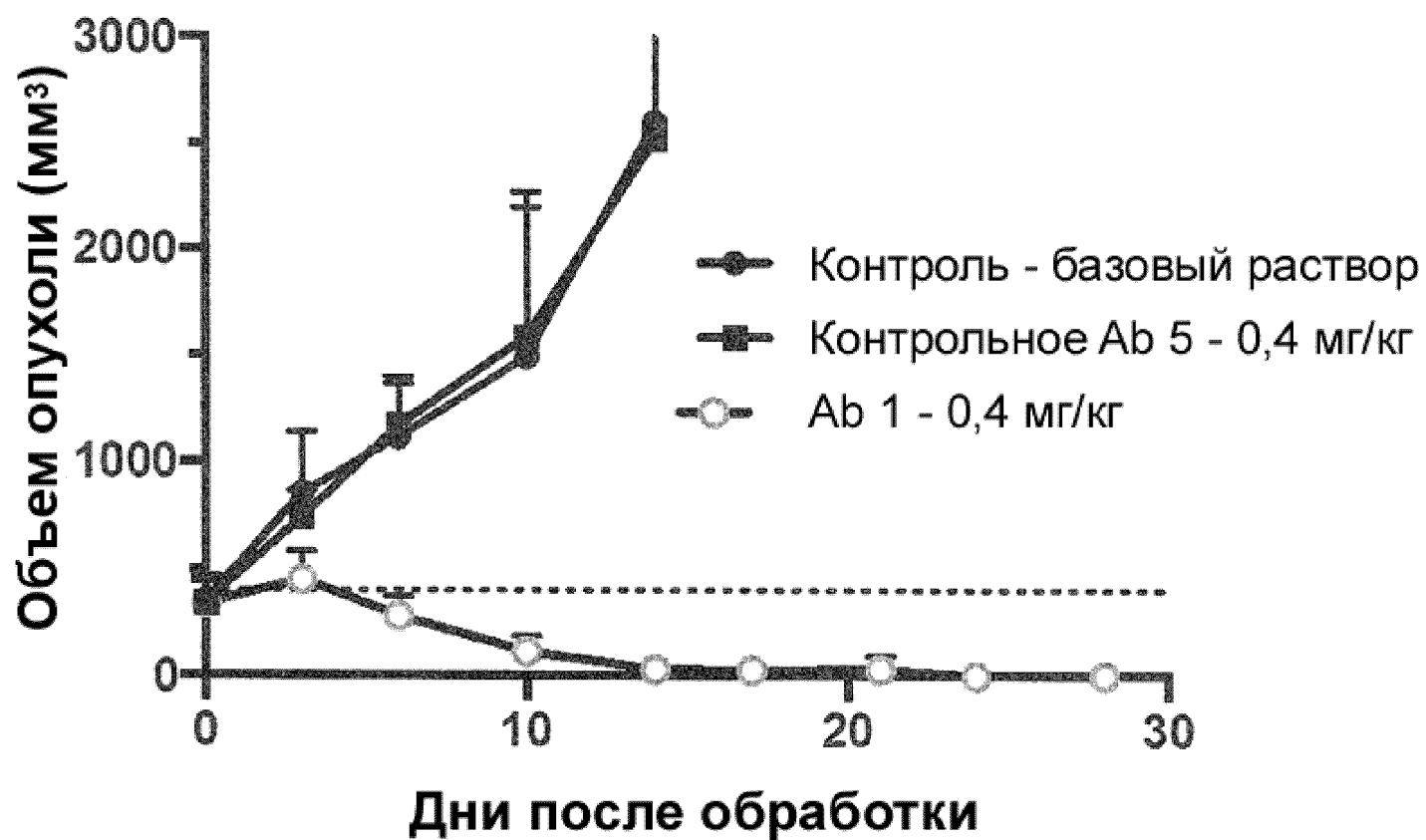


ФИГ. 8А



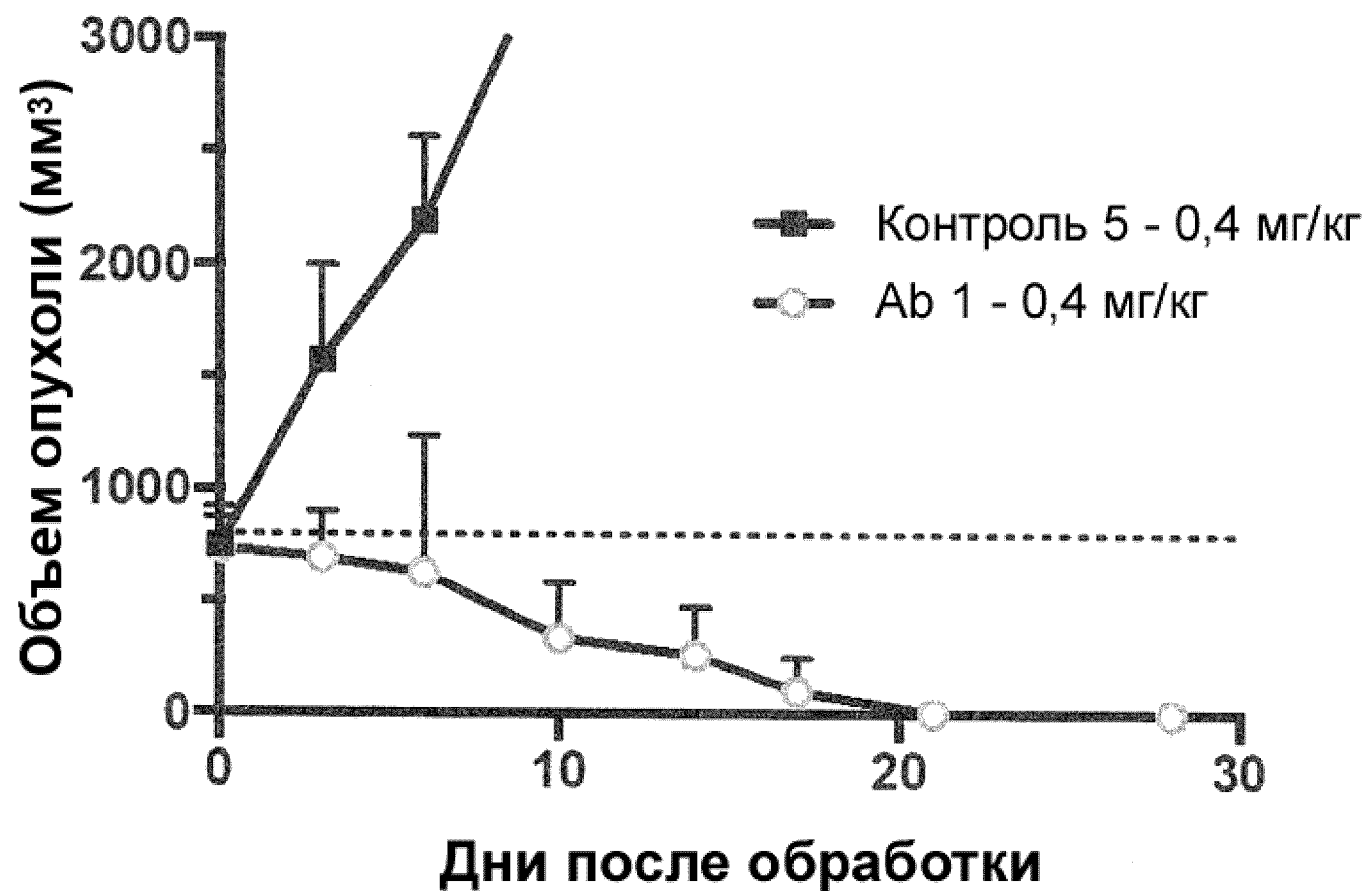
ФИГ. 8В

Обработка развившихся ~200-400 мм³ опухолей у мышей NSG,
обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом



ФИГ. 9

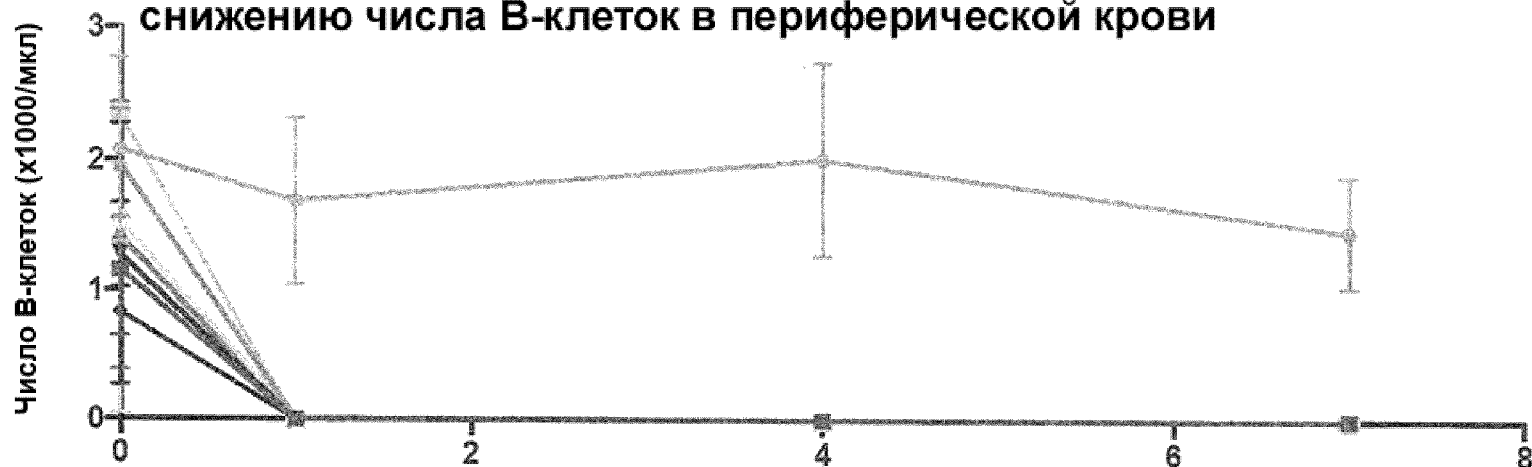
Обработка развившихся ~500-900 мм³ опухолей у мышей NSG,
обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом



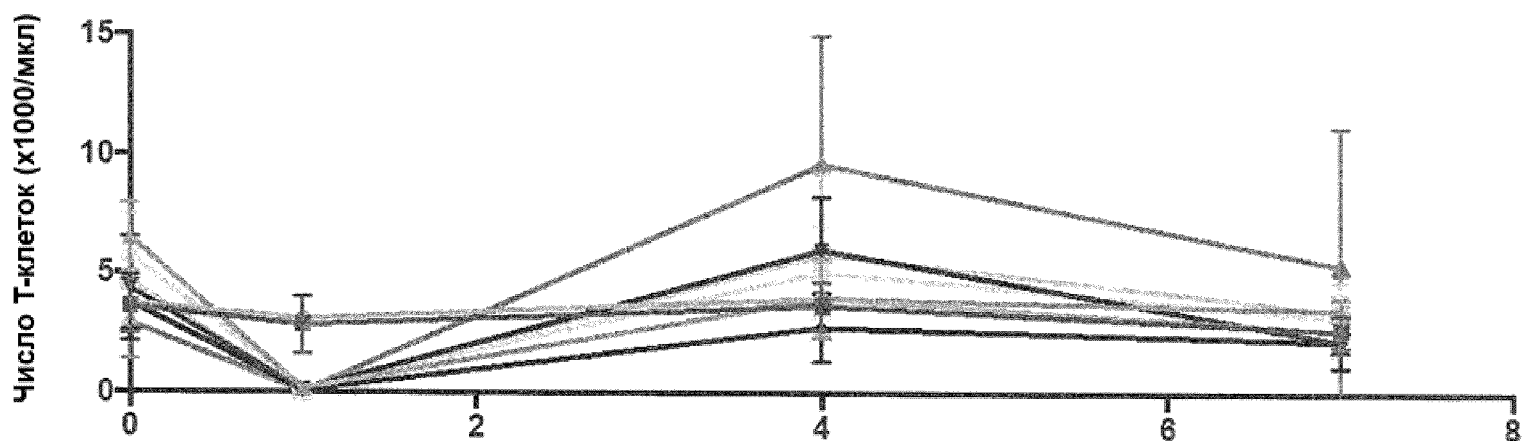
ФИГ. 10

CD20 моноспецифические и CD3xCD20 биспецифические антитела приводят к снижению числа В-клеток в периферической крови

ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

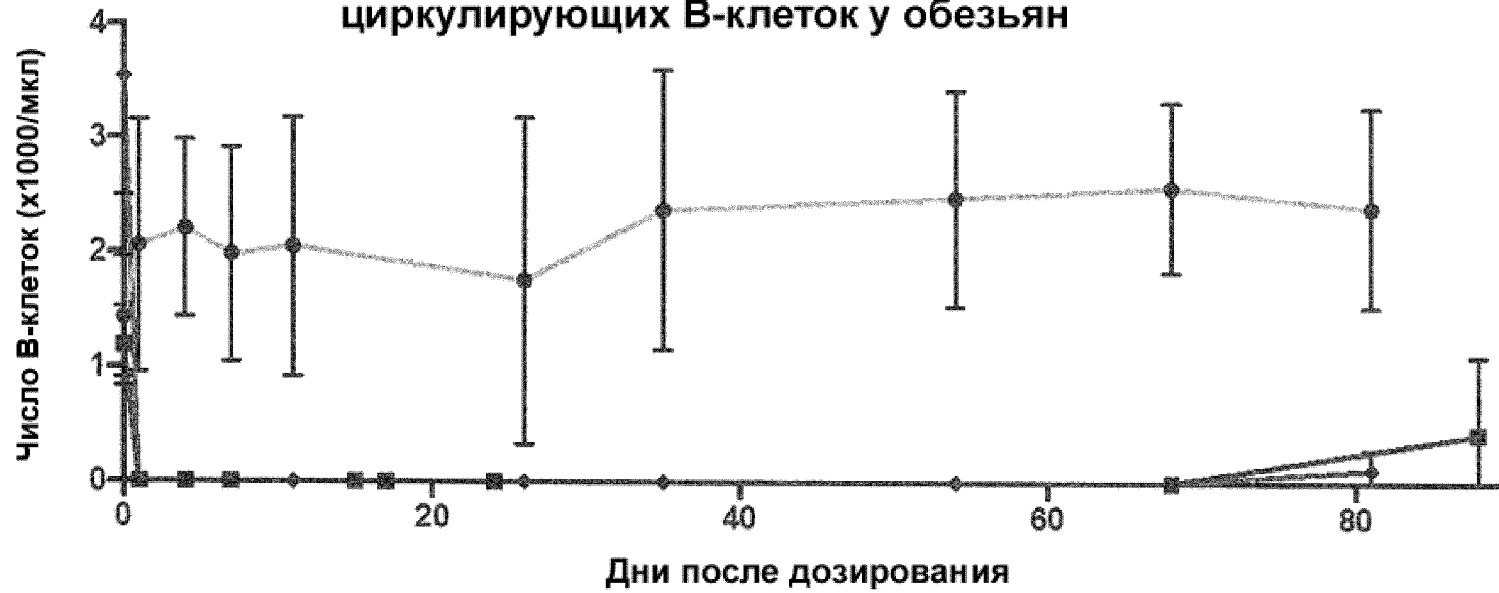


День после дозирования

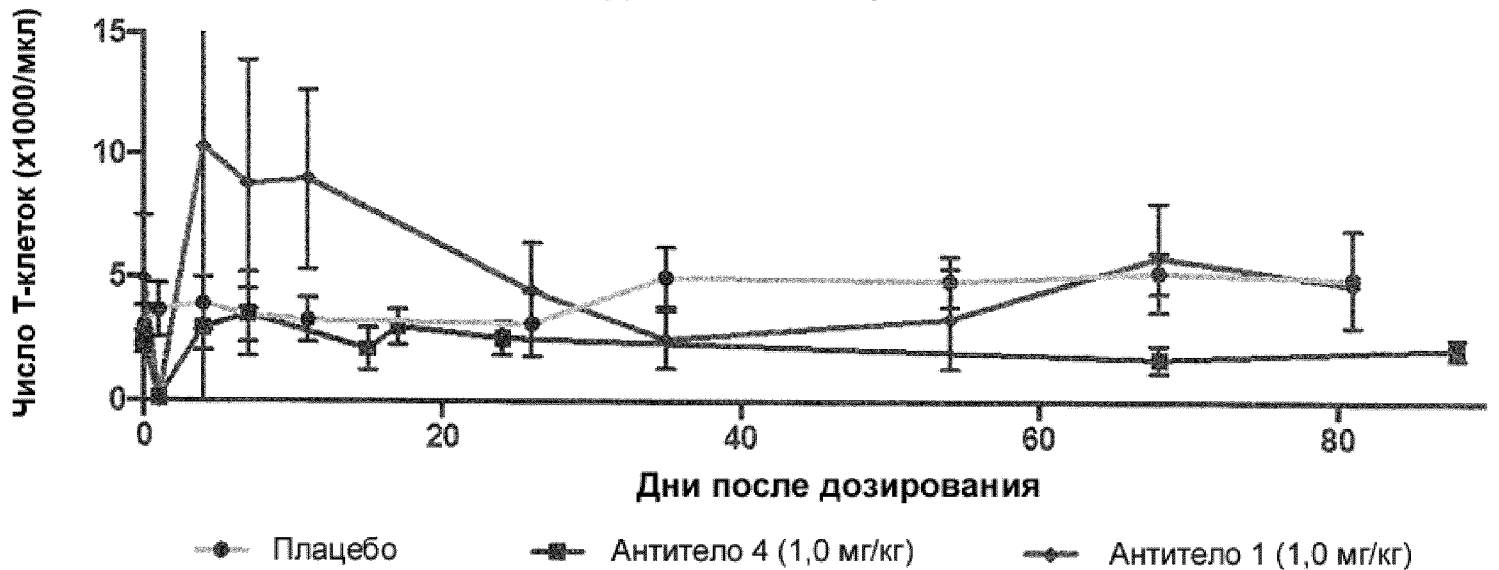
- | | | |
|-------------------|---------------------|-------------------------|
| Ab 4 (0,01 мг/кг) | Плацебо | Антитело 1 (0,01 мг/кг) |
| Ab 4 (0,1 мг/кг) | Ритуксан (30 мг/кг) | Антитело 1 (0,1 мг/кг) |
| Ab 4 (1,0 мг/кг) | | Антитело 1 (1,0 мг/кг) |

CD3xCD20 биспецифические антитела опосредуют снижение числа циркулирующих В-клеток у обезьян

ФИГ. 12А

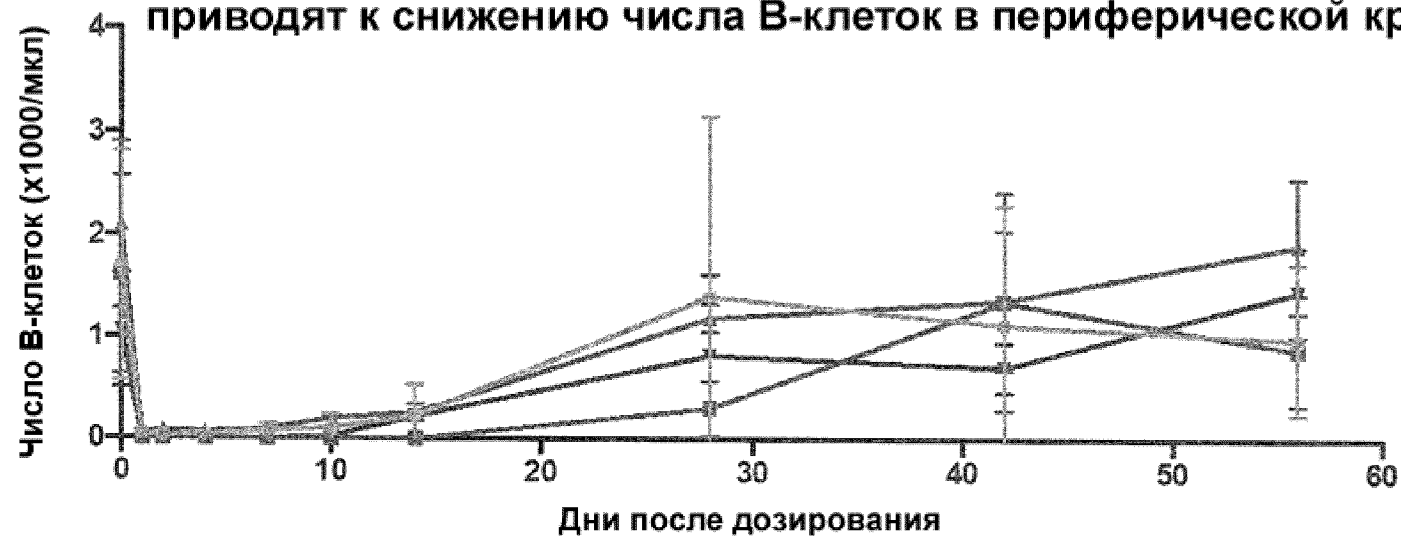


ФИГ. 12В

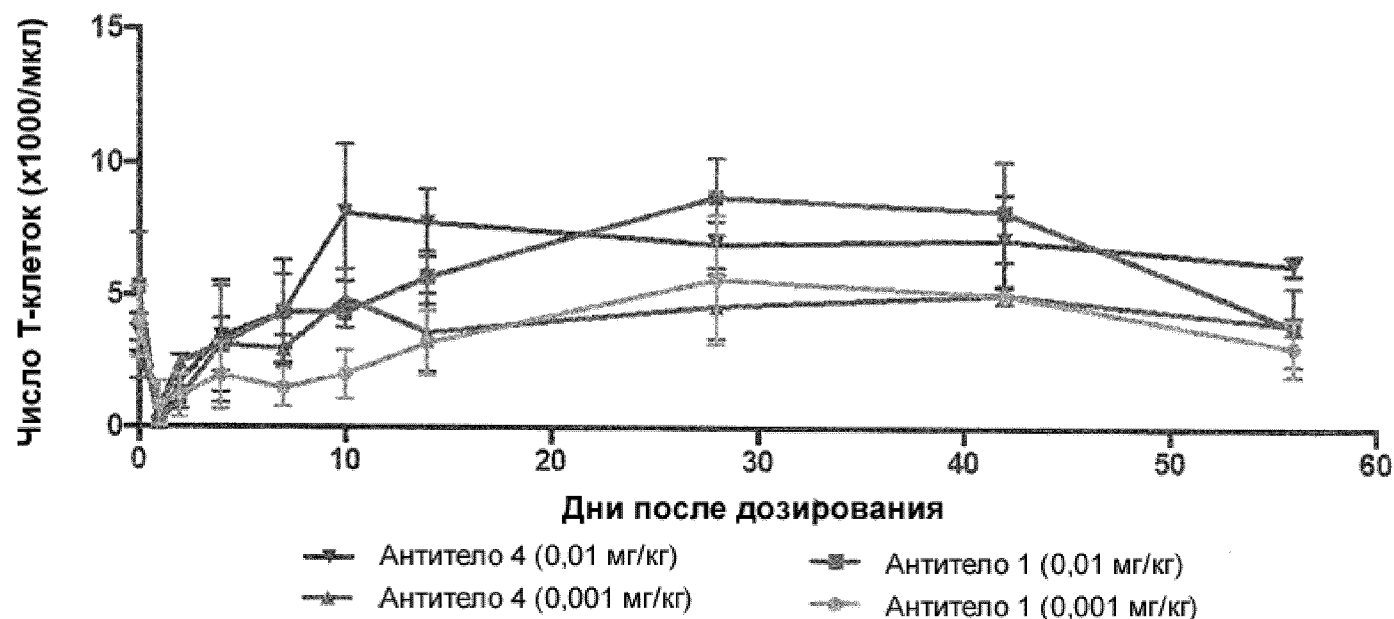


**CD3xCD20 биспецифические антитела при низких дозирочных уровнях
приводят к снижению числа В-клеток в периферической крови**

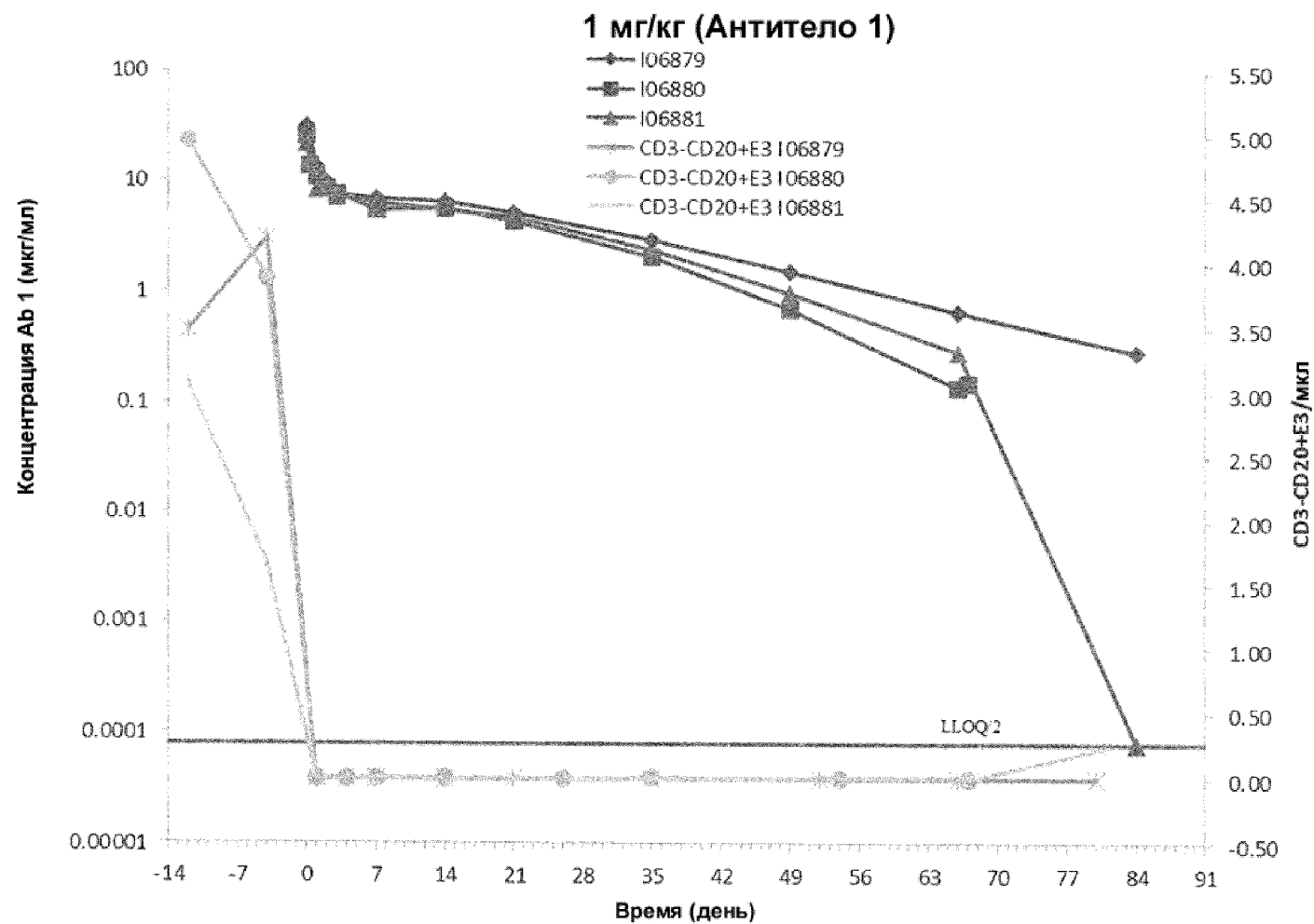
ФИГ. 13А



ФИГ. 13В

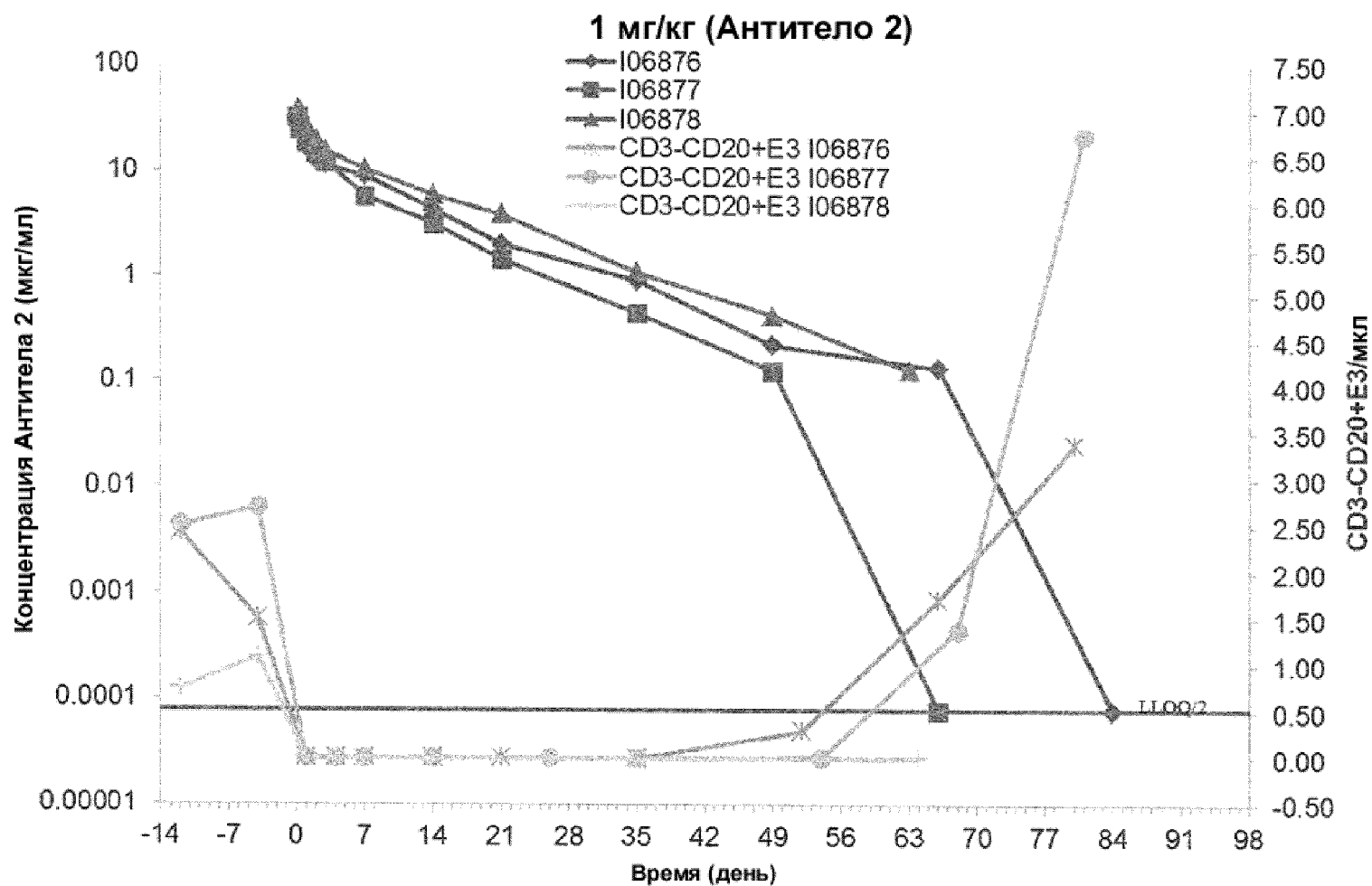


Восстановление В-клеток коррелирует с отсутствием выявляемых уровней
циркулирующих биспецифических Ab



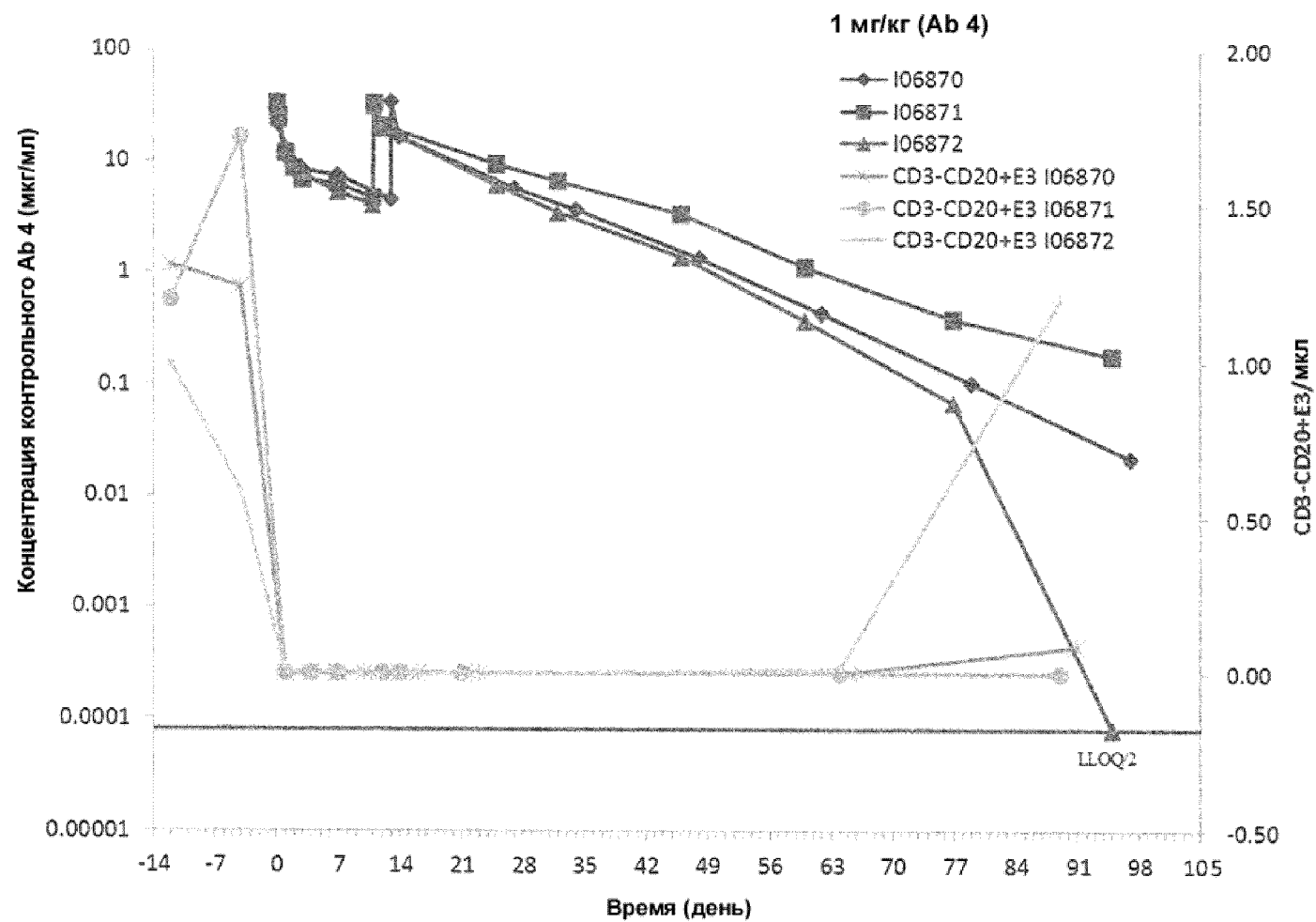
ФИГ. 14

Восстановление В-клеток коррелирует с отсутствием выявляемых уровней циркулирующих биспецифических Ab



ФИГ. 15

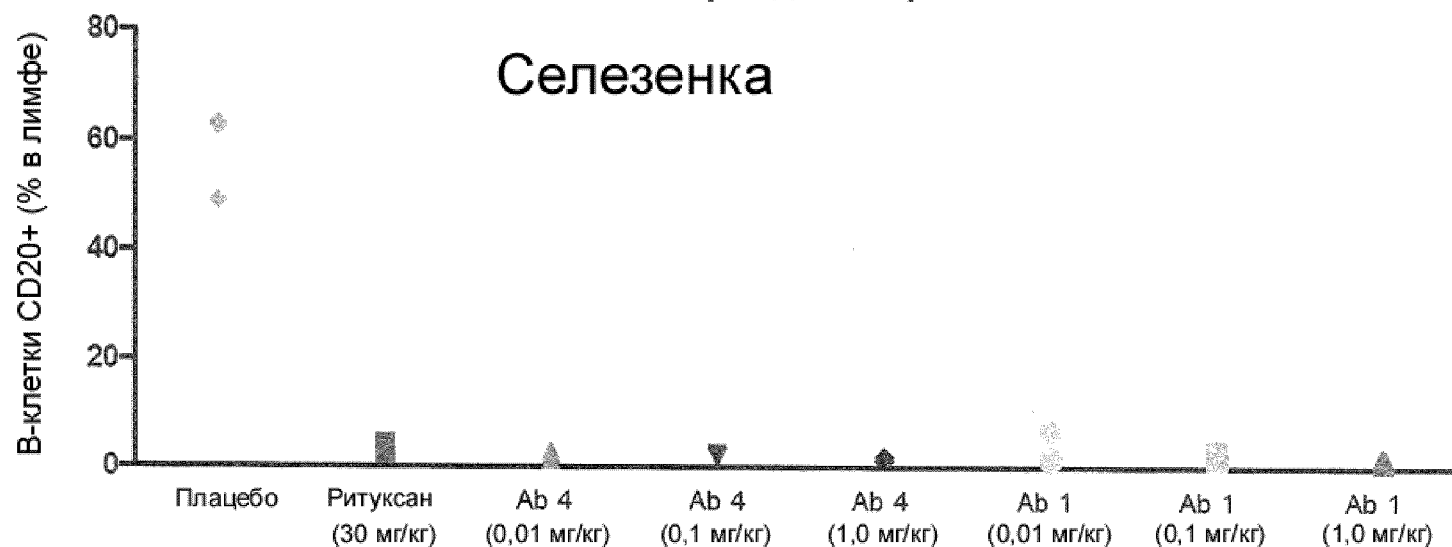
Восстановление В-клеток коррелирует с отсутствием выявляемых уровней циркулирующих биспецифических Ab



ФИГ. 16

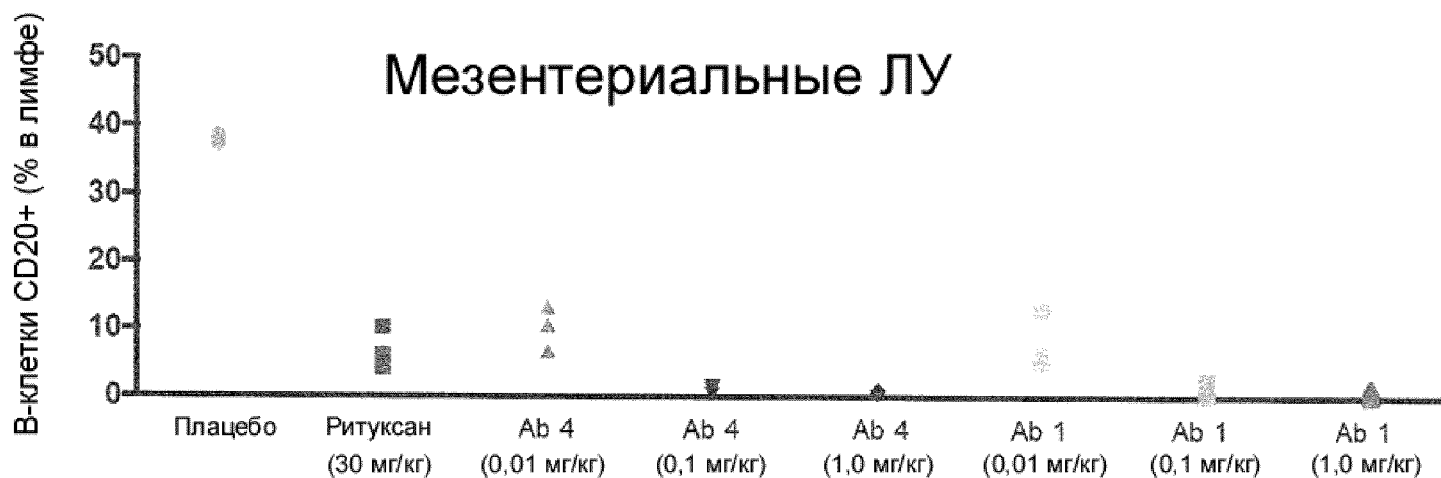
CD3хCD20 биспецифические антитела проявляют способность к снижению числа В-клеток в лимфоидных органах

ФИГ. 17А



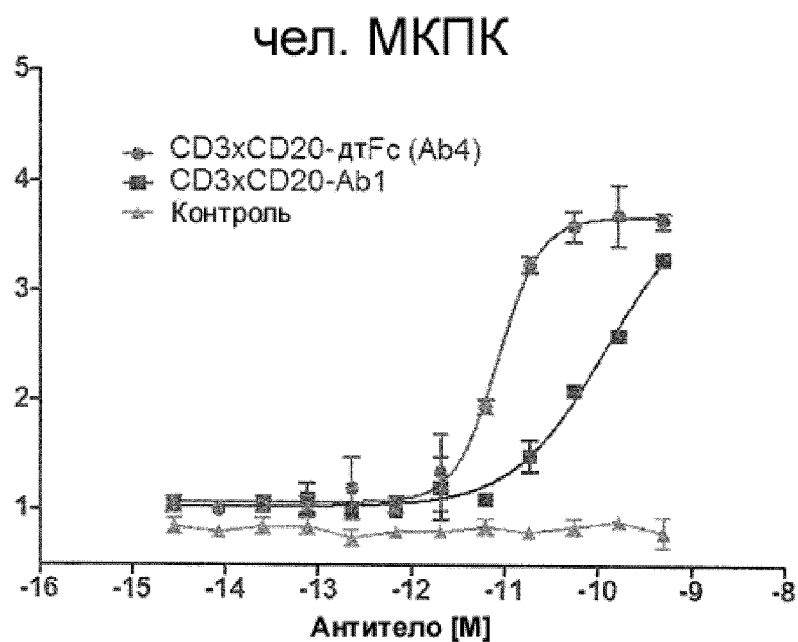
18/26

ФИГ. 17В

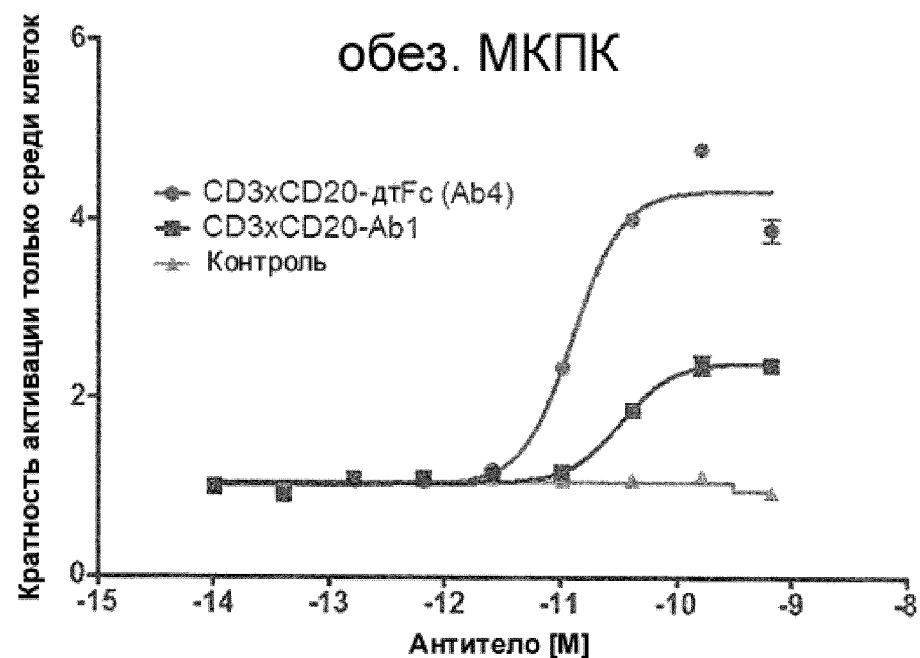


CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию Т-клеток *in vitro*

Кратность активации только среди клеток

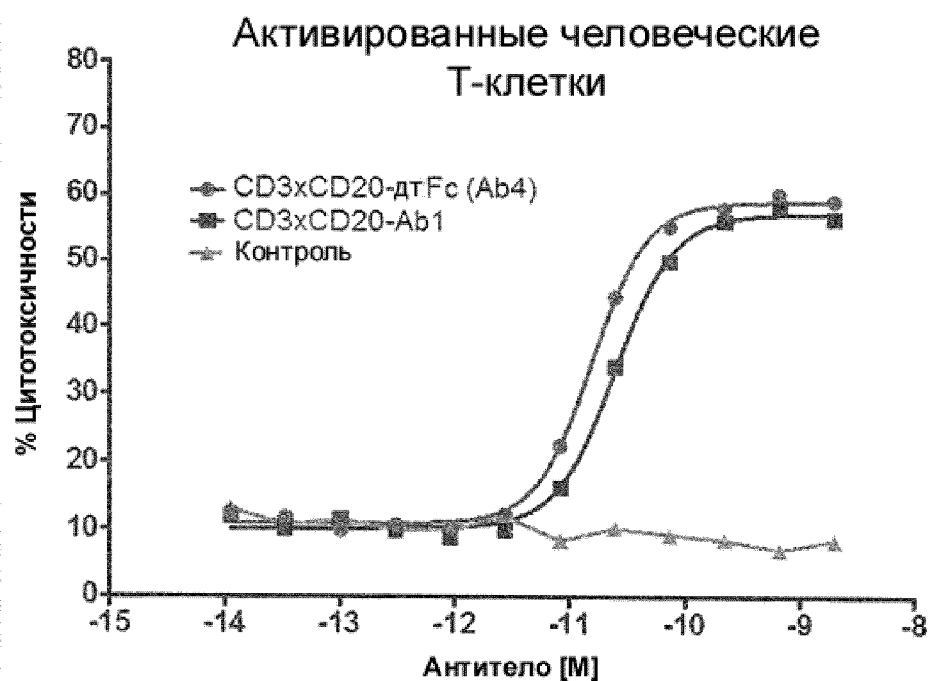


ФИГ. 18А

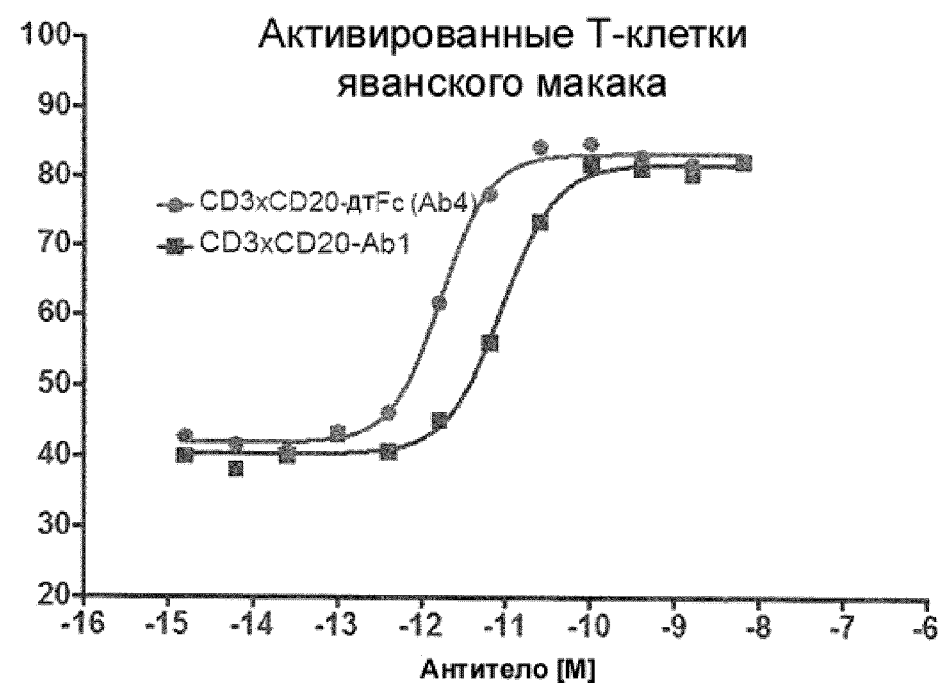


ФИГ. 18В

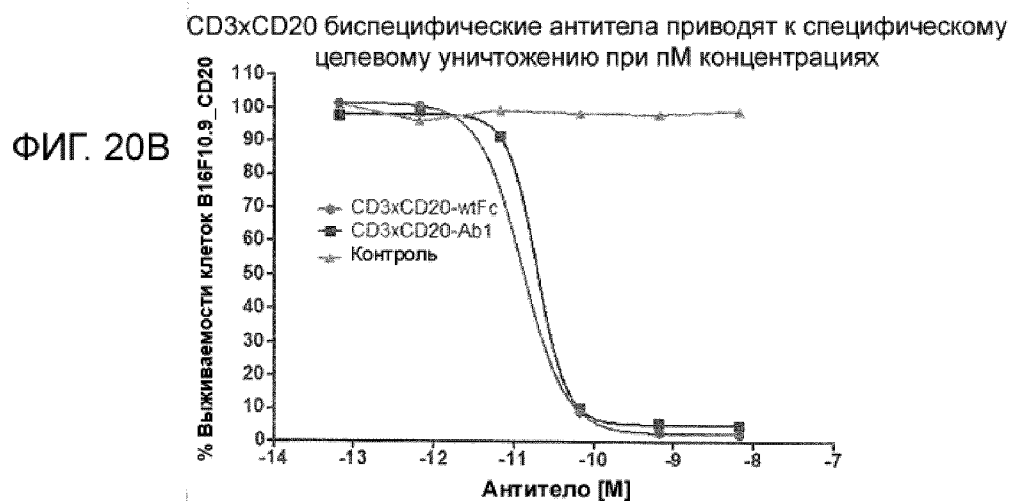
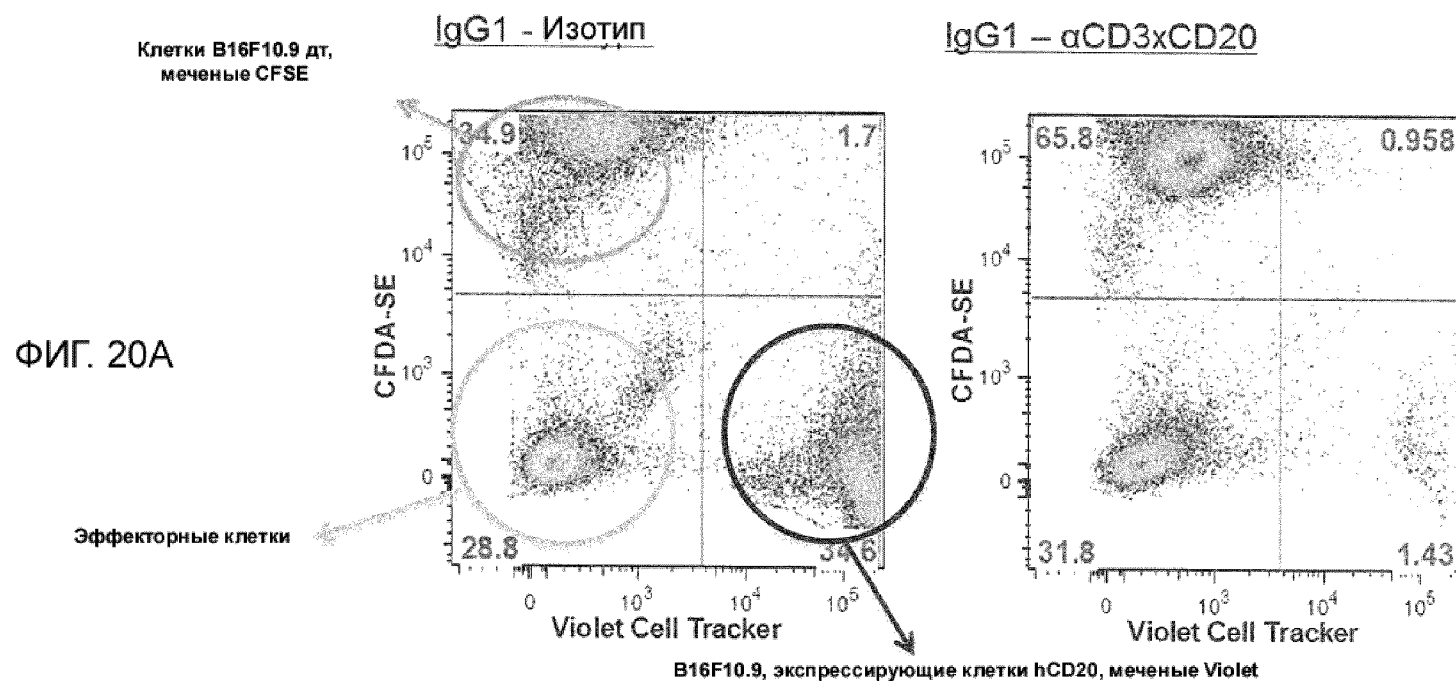
CD3xCD20 биспецифические антитела опосредуют уничтожение клеток посредством активированных Т-клеток в *in vitro* биоанализе



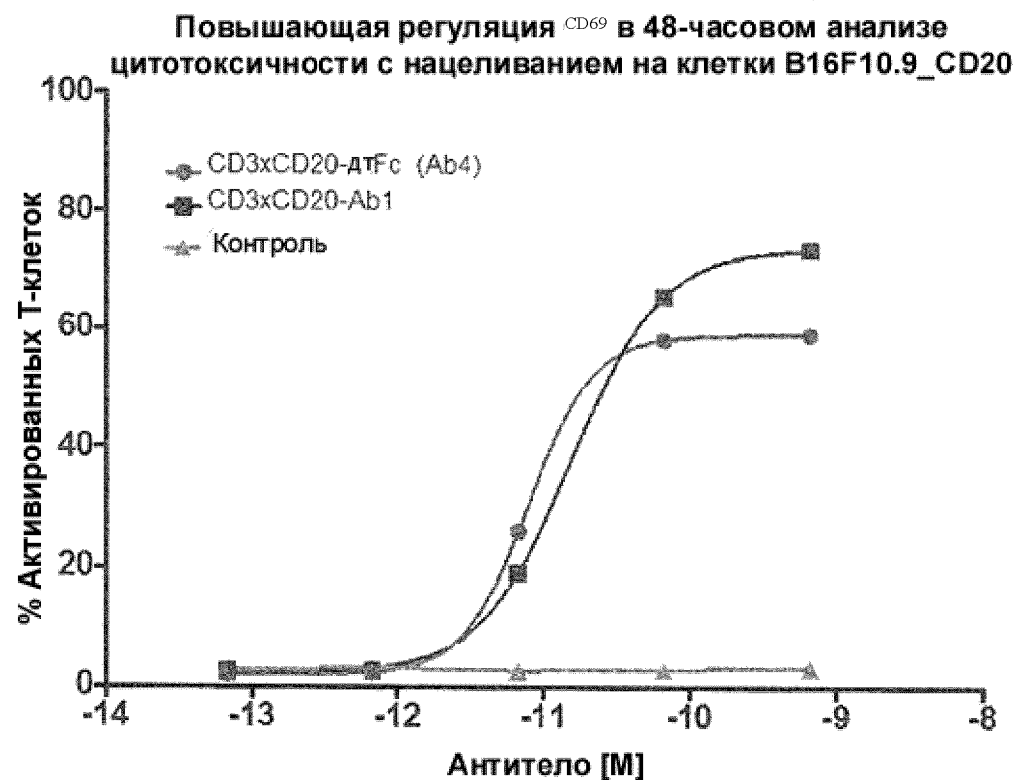
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В

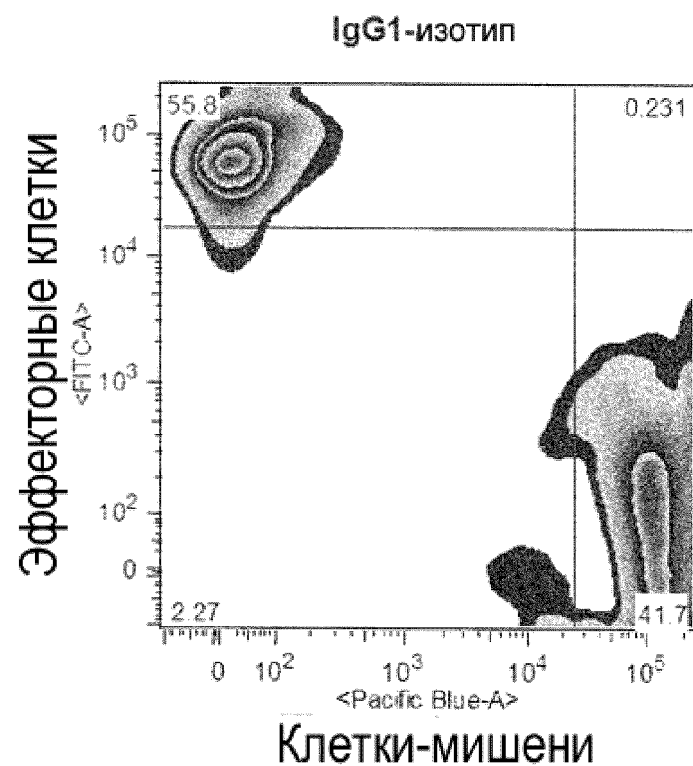


Маркеры активации Т-клеток индуцируются обработкой биспецифическими Ab

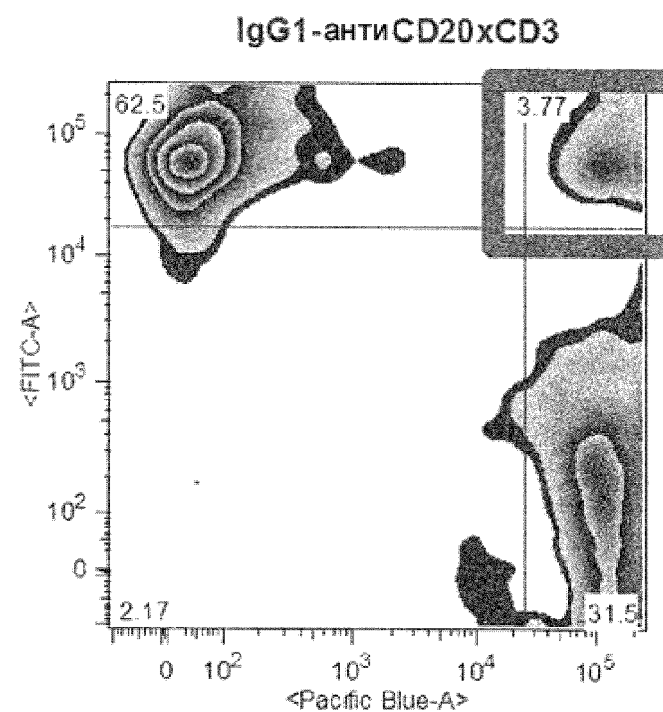


ФИГ. 21

CD3xCD20 биспецифические антитела индуцируют кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями

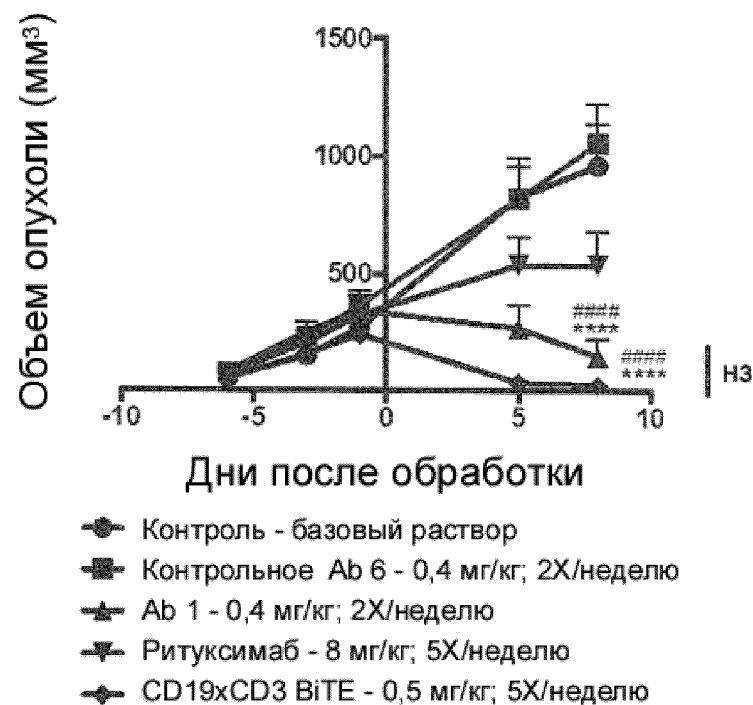


ФИГ. 22А



ФИГ. 22В

Обработка мышей NSG с развившимися опухолями Raji



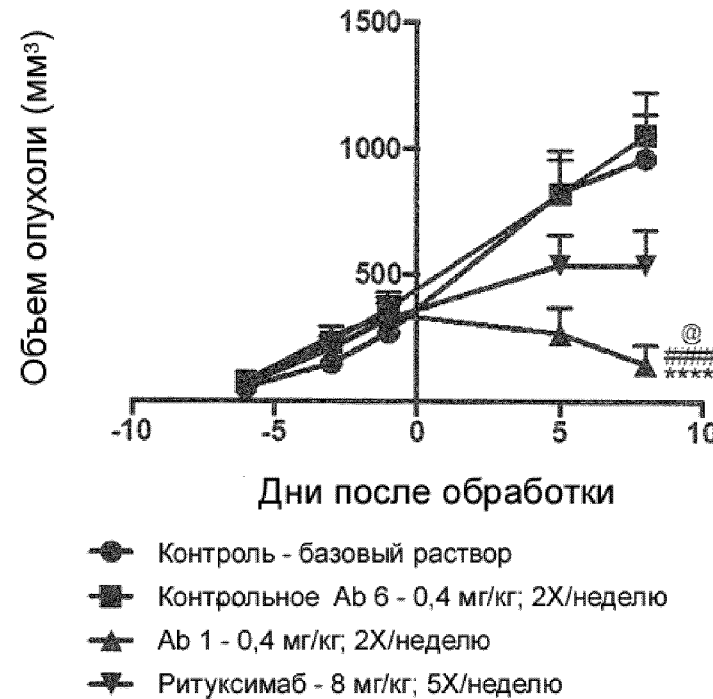
**** - по сравнению с контролем; ##### - по сравнению с Ab6-контролем;

@ - по сравнению с ритуксимабом; нз - не значительно

Данные представляют обобщенные данные по $n=4-6$ мышам на группу. Данные выражали как среднее (СПС) и анализировали при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и ретроспективного анализа, чтобы изучить значимые эффекты (критерий Тьюки для двухфакторного анализа ANOVA). Чтобы проанализировать данные при помощи двухфакторного анализа ANOVA, двух мышей из группы CD19xCD3 BiTE и одну мышь из группы Ab 1 исключили из этого обобщенного графика вследствие ранней смерти.

ФИГ. 23

Обработка мышей NSG с развившимися опухолями Raji



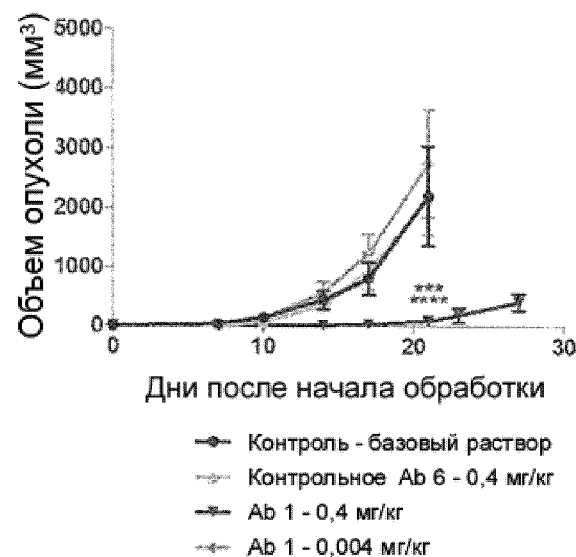
**** - по сравнению с контролем; ##### - по сравнению с Ab6-контролем;

@ - по сравнению с ритуксимабом;

Данные представляют обобщенные данные по n=4-6 мышам на группу. Данные выражали как среднее (СПС и анализировали при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и ретроспективного анализа, чтобы изучить значимые эффекты (критерий Тьюки для двухфакторного анализа ANOVA). Чтобы проанализировать данные при помощи двухфакторного анализа ANOVA, одну мышь из группы Ab 1 исключили из этого обобщенного графика вследствие ранней смерти.

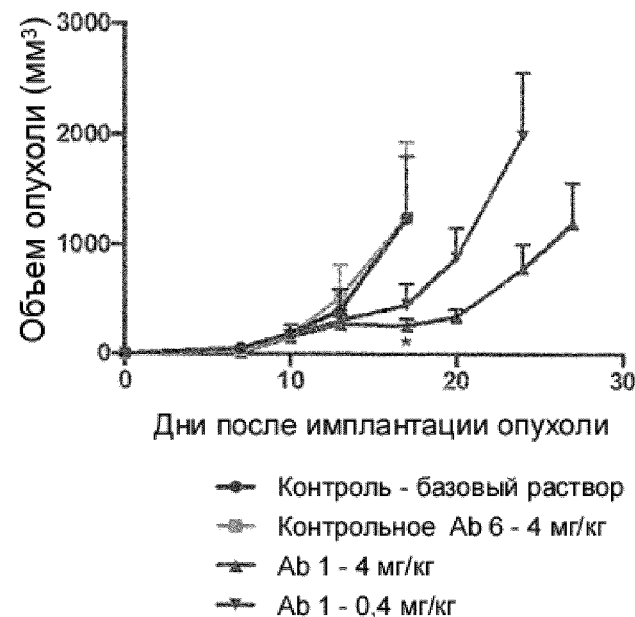
ФИГ. 24

Обработка мышей hCD3 с имплантированными опухолями CD20/B16F10.9



**** - по сравнению с баз. раствором; *** - по сравнению с Ab6-контролем
Данные представляют обобщенные данные по n=5 мышам на группу. Данные выражали как среднее (СПС и анализировали при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и ретроспективного анализа, чтобы изучить значимые эффекты (критерий Тьюки для двухфакторного анализа ANOVA).

ФИГ. 25А



* - по сравнению с баз. раствором и антителом-контролем;
Данные представляют обобщенные данные по n=5 мышам на группу. Данные выражали как среднее (СПС и анализировали при помощи дисперсионного анализа (ANOVA)).

ФИГ. 25В