



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.09.21**

**(21)** Номер заявки  
**201890368**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.07.29**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ПСМА, БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ПСМА И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

**(31)** 62/199,823; 62/222,590; 62/351,823

**(32)** 2015.07.31; 2015.09.23; 2016.06.17

**(33)** US

**(43)** 2018.10.31

**(86)** PCT/US2016/044732

**(87)** WO 2017/023761 2017.02.09

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

**(72)** Изобретатель:  
**Кишнер Джессика Р., Кроуфорд  
Элисон, Терстон Гэвин, Смит Эрик,  
Абер Лорик, Даджеон Дрю, Рафик  
Ашик (US)**

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

**(56)** Ralf Lutterbuese ET AL.: "Preclinical characterization of MT112/BAY 2010112, a novel PSMA/CD3-bispecific BiTE antibody for the treatment of prostate cancer", 15 April 2011 (2011-04-15), XP055251943, Retrieved from the Internet: URL: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8\\_Supplement/4561](http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/4561) [retrieved on 2016-02-22] abstract

WO-A1-2011121110

WO-A2-2013158856

WO-A1-2013145714

WO-A2-2010037836

BAUM VOLKER ET AL.: "Antitumor activities of PSMA\*CD3 diabodies by redirected T-cell lysis of prostate cancer cells", IMMUNOTHERAPY, FUTURE MEDICINE, LONDON, vol. 5, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 27-38, XP002758546, ISSN: 1750-7448, page 33, paragraph 3 - page 34, right-hand column, paragraph 1

FRIEDRICH: "Abstract 3526: Subcutaneous administration of PSMA/CD3-bispecific BiTE antibody MT112/BAY 2010112 leads to complete remission of human prostate cancer xenografts in mice Cancer Research", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 8 Supplement, 15 April 2012 (2012-04-15), page 3526, XP055306961, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2012-3526, abstract

KERSTIN FORTMÜLLER ET AL.: "Effective targeting of prostate cancer by lymphocytes redirected by a PSMA\*CD3 bispecific single-chain diabody", PROSTATE, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 71, no. 6, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 588-596, XP002648688, ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/PROS.21274 [retrieved on 2010-10-13] page 591, right-hand column, paragraph 1; figure 1 page 592, right-hand column

BÜHLER P ET AL.: "A bispecific diabody directed against prostate-specific membrane antigen and CD3 induces T-cell mediated lysis of prostate cancer cells", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 57, no. 1, 20 June 2007 (2007-06-20), pages 43-52, XP019561052, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0348-6 the whole document, page 47, left-hand column - page 48; figure 1

**(57)** В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с простатспецифическим мембранным антигеном (ПСМА), биспецифичные антитела, которые связываются с ПСМА и CD3, а также способы применения указанных антител. Согласно определенным вариантам реализации антитела по изобретению связывают ПСМА человека с высокой аффинностью и связывают CD3, индуцируя пролиферацию Т-клеток человека. Настоящее изобретение включает антитела, которые связывают ПСМА и CD3 и вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих ПСМА. Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с ПСМА человека. Согласно определенным вариантам реализации биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению способны к ингибированию роста опухолей предстательной железы, экспрессирующих ПСМА. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению подходят для лечения заболеваний и нарушений, при которых

активирующий или индуцируемый направленный иммунный ответ является желательным и/или терапевтически полезным. Например, антитела согласно настоящему изобретению являются подходящими для лечения различных типов рака.

038603 B1

038603 B1

---

### Ссылка на перечень последовательностей

В настоящее описание включен посредством ссылки перечень последовательностей, поданный в машиночитаемой форме в виде файла 10173WO01\_seqlisting.txt, созданного 22 июля 2016 года и содержащего 630026 байт.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые являются специфичными в отношении простатспецифического мембранного антигена (ПСМА), а также к способам их применения. Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают ПСМА и CD3, и к способам их применения.

### Уровень техники

Простатспецифический мембранный антиген (ПСМА), также известный как фолатгидролаза 1 (FOLH1), представляет собой интегральный не поддающийся шеддингу гликопротеин мембраны, который в высокой степени экспрессируется в эпителиальных клетках предстательной железы и является маркером клеточной поверхности рака предстательной железы. Экспрессия данного антигена сохраняется при кастрационно-резистентном раке предстательной железы - состоянии с неблагоприятным исходом и ограниченными вариантами лечения. Были исследованы способы лечения рака предстательной железы путем нацеливания на ПСМА. Например, Иттрий-90 капромаб представляет собой радиотерапевтическое средство, содержащее моноклональное антитело против внутриклеточного эпитопа ПСМА. В другом примере J591 моноклональное антитело против внеклеточного эпитопа ПСМА является частью радиотерапевтического средства Лютеций-177 J591, а также MLN2704, в котором майтанзиноид 1 (DM1, антимикротубулиновое средство) конъюгирован с J591. Данные варианты терапии сопровождались токсичностью. ПСМА также экспрессируется в новообразованных сосудах других опухолей, таких как карцинома мочевого пузыря, почки, желудка и толстой и прямой кишки.

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, который экспрессируется на Т-клетках совместно с комплексом Т-клеточного рецептора (ТКР) и который необходим для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется в результате димерного объединения двух из четырех различных цепей: эпсилон, дзета, дельта и гамма. Димерные комбинации CD3 включают гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета. Было показано, что антитела против CD3 кластеризуют CD3 на Т-клетках, что вызывает активацию Т-клетки способом, подобным ангажированию ТКР молекулами МНС, загруженными пептидами. В связи с этим предложены антитела против CD3 для терапевтических целей, включающих активацию Т-клеток. Кроме того, предложены биспецифичные антитела, которые способны к связыванию с CD3 и антигеном-мишенью, для вариантов терапевтического применения, связанных с направлением иммунных ответов Т-клеток к тканям и клеткам, экспрессирующим антиген-мишень.

Антигенсвязывающие молекулы, нацеленные на ПСМА, а также биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как ПСМА, так и CD3, будут подходящими в терапевтических условиях, в которых необходимо специфичное нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих ПСМА.

### Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту в настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ПСМА человека. Антитела согласно данному аспекту настоящего изобретения являются подходящими среди прочего для нацеливания на клетки, экспрессирующие ПСМА. В настоящем изобретении также предложены биспецифичные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ПСМА человека и CD3 человека. Биспецифичные антитела согласно данному аспекту настоящего изобретения являются подходящими, среди прочего, для нацеливания на Т-клетки, экспрессирующие CD3, и для стимуляции активации Т-клеток, например, в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих ПСМА, является полезным или желательным. Например, биспецифичные антитела могут направлять опосредованную CD3 активацию Т-клеток к специфичным клеткам, экспрессирующим ПСМА, таким как клетки опухоли предстательной железы.

Иллюстративные антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению представлены в табл. 1 и 2 настоящего описания. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (heavy chain variable regions, HCVR) и переменных областей легкой цепи (light chain variable regions, LCVR), а также участки, определяющие комплементарность тяжелой цепи (heavy chain complementarity determining regions, HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и участки, определяющие комплементарность легкой цепи (light chain complementarity determining regions, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против ПСМА. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител против ПСМА.

В настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по



Согласно близкому варианту реализации в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), который содержится в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые определены любым из иллюстративных антител против ПСМА, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, который содержится в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66/146 (например, H1H11810P2); и 122/130 (например, H1H3465P). Способы и методики идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в пределах указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные общепринятые способы, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение по Kabat основано на вариабельности последовательности, определение по Chothia основано на расположении областей структурных петель, и определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. См., например, публикации Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:921-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также можно использовать для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против ПСМА или части указанных антител. Например, в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по

меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, причем HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 определен любым из иллюстративных антител против ПСМА, перечисленных в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, причем LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 определен любым из иллюстративных антител против ПСМА, перечисленных в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и причем LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей, и полинуклеотидную последовательность, которая выбрана из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей. Согласно определенным вариантам реализации в данном аспекте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, причем HCVR и LCVR оба получены от одного и того же антитела против ПСМА, представленного в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные векторы экспрессии, способные к экспрессии полипептида, содержащего варибельную область тяжелой или легкой цепи антитела против ПСМА. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или частей указанных антител посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих получение антител или фрагментов антител, и выделение антител или фрагментов антител, полученных таким образом.

Настоящее изобретение включает антитела против ПСМА, содержащие модифицированный паттерн гликозилирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитела, в котором отсутствует группа фукозы на олигосахаридной цепи, могут являться подходящими, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. публикацию Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Согласно другим вариантам применения модификацию галактозилирования можно осуществить с целью изменения комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которое специфично связывает ПСМА, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно близкому аспекту в настоящем изобретении описана композиция, которая представляет собой комбинацию антитела против ПСМА и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое с пользой объединяют с антителом против ПСМА. Дополнительные варианты комбинированной терапии и совместные составы, содержащие антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению, раскрыты в другом месте настоящего описания.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены терапевтические способы нацеливания на опухолевые клетки/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих ПСМА, с применением антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело против ПСМА согласно настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых случаях антитела против ПСМА (или антигенсвязывающие фрагменты указанных антител) можно использовать для лечения рака предстательной железы или можно модифицировать с целью повышения цитотоксичности данных антител с применением способов, включающих, без ограничения, модификацию Fc-доменов для увеличения АЗКЦ (см., например, Shield et al. (2002) JBC 277:26733), радиоиммунотерапию (Akhtar, et al., 2012, Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Therapeutics; Adv Urol. 2012: 973820), конъюгаты антитело-лекарственный препарат (Olson, WC and Israel, RJ, 2014, Front Biosci (Landmark Ed). 19: 12-33; DiPippo, et al. Feb 15, 2015, The Prostate, 75(3): 303-313, впервые опубликована онлайн 18 октября 2014 года) или другие способы повышения эффективности абляции опухоли.

Настоящее изобретение также включает применение антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению при изготовлении медицинского препарата для лечения заболевания или нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими ПСМА, или вызванного данными клетками.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены моноспецифичные антитела против ПСМА для применения в диагностике, такие как, например, реактивы для визуализации.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены терапевтические способы стимуляции активации Т-клеток с применением антитела против CD3 или антигенсвязывающей части антитела согласно настоящему изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает простатспецифический мембранный антиген (ПСМА) человека с равновесной константой диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее приблизительно 80 нМ, которую измеряют в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает ПСМА человека с диссоциационным периодом полувыведения ( $t_{1/2}$ ) более приблизительно 10 мин, который измеряют в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

В настоящем изобретении также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с ПСМА человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленную в табл. 1. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с ПСМА человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; и 138/146.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом на ПСМА человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленную в табл. 1. Согласно другому аспекту антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом на ПСМА человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; 138/146.

В настоящем изобретении также предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ПСМА человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит участки, определяющие комплементарность (CDR), варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в табл. 1; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в табл. 1. Согласно другому аспекту выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; 138/146. Согласно еще одному аспекту выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, которые выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-1644-1646-1648; 12-14-16-1644-1646-1648; 20-22-24-1644-1646-1648; 28-30-32-1644-1646-1648; 36-38-40-1644-1646-1648; 44-46-48-1644-1646-1648; 52-54-56-1644-1646-1648; 60-62-64-1644-1646-1648; 68-70-72-1644-1646-1648; 76-78-80-1644-1646-1648; 84-86-88-1644-1646-1648; 92-94-96-1644-1646-1648; 100-102-104-1644-1646-1648; 108-110-112-1644-1646-1648; 116-118-120-1644-1646-1648; 124-126-128-132-134-136; 140-142-144-148-150-152.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает ПСМА человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122 и 138;

(b) вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130 и 146. Согласно следующему аспекту настоящего изобретения выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; 138/146.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, антитела), которые связывают ПСМА и CD3. Такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также называют в настоящем документе "биспецифичными молекулами против ПСМА/против CD3", "биспецифичными молекулами против CD3/против ПСМА" или "бсАТ ПСМАх CD3". Часть биспецифичной молекулы против ПСМА/против CD3, направленная против ПСМА, является подходящей для нацеливания на клетки (например, опухолевые клетки), которые экспрессируют ПСМА (например, опухоли предстательной железы), и часть биспецифичной молекулы, направленная против CD3, является подходящей для активации Т-клеток. Одновременное связывание с ПСМА на опухолевой клетке и с CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (клеточный лизис) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой. Вследствие этого биспецифичные молекулы против ПСМА/против CD3 согласно настоящему изобретению являются подходящими, среди прочего, для лечения заболеваний и нарушений, связанных с опухолями, экспрессирующими ПСМА, или вызванных данными опухолями (например, типов рака предстательной железы).

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно данному аспекту настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА. Настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы против ПСМА/против CD3 (например, биспецифичные антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с вариабельной областью легкой цепи (LCVR). Согласно определенным иллюстративным вариантам реализации настоящего изобретения каждый из антигенсвязывающего домена против CD3 и антигенсвязывающего домена против ПСМА содержит отличные отдельные HCVR, спаренные с общей LCVR. Например, как проиллюстрировано в примере 4 настоящего документа, были сконструированы биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3, причем первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, полученную из антитела против CD3; и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА, причем второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученную из антитела против ПСМА, спаренную с LCVR, полученной из антитела против CD3 (например, ту же LCVR, которая содержится в антигенсвязывающем домене против CD3). Другими словами, в иллюстративных молекулах, раскрытых в настоящем документе, спаривание HCVR из антитела против ПСМА с LCVR из антитела против CD3 позволяет получить антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА (но не связывает CD3). Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержат отдельные HCVR против CD3 и против ПСМА, но содержат общую LCVR против CD3. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы содержат отдельные HCVR против CD3 и против ПСМА, но содержат общую LCVR. Аминокислотная последовательность данной LCVR представлена, например, в SEQ ID NO:1386, и аминокислотные последовательности соответствующих CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3) представлены в SEQ ID NO:1388, 1390 и 1392 соответственно. Для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, которые содержат две различные тяжелые цепи, связанные с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный от одного из двух различных сегментов гена вариабельной области легкой цепи человека, можно использовать генетически модифицированных мышей. В качестве альтернативы вариабельные области тяжелых цепей можно спарить с общей легкой цепью и можно рекомбинантным способом экспрессировать в клетках-хозяевах. Соответственно антитела согласно настоящему изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с одной перегруппированной легкой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из сегмента гена Vk1-39 или сегмента гена Vk3-20 человека. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из сегмента гена Vk1-39 человека, перегруппированный с сегментом гена Jk5 человека или Jk1 человека.

В настоящем изобретении предложены биспецифичные молекулы против CD3/против ПСМА, в ко-



стоящего документа, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей, и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, представленную в табл. 12, 15 и 20 настоящего документа, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 12, 14, 15, 18 и 20 настоящего документа.

В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит участки, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность, представленную в табл. 12, 14 или 18, и участки, определяющие комплементарность, легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, представленную в табл. 12, 15 или 20.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит участки, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариательной области тяжелой цепи (HCVR), которые выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506, 1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 и 1626, и участки, определяющие комплементарность, легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 162, 930 и 1642.

В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит три участка, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три участка, определяющих комплементарность, легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 924, 156, 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620 и 1628; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622 и 1630; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624 и 1632; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 932, 164 и 1644; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 166, 934 и 1646; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168, 936 и 1648.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 922/930, 154/162, 1482/1642, 1490/1642, 1498/1642, 1506/1642, 1514/1642, 1522/1642, 1530/1642, 1538/1642, 1546/1642, 1554/1642, 1562/1642, 1570/1642, 1578/1642, 1586/1642, 1594/1642, 1602/1642, 1610/1642, 1618/1642 и 1626/1642.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении приложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит три участка, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три участка, определяющих комплементарность, легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3) и в которой второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА человека, содержит три участка, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три участка, определяющих комплементарность, легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3); причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 924, 156, 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620 и 1628; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622 и 1630; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624 и 1632; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 164, 932 и 1644; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 166, 934 и 1646; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168, 936 и 1648; и причем A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124 и 68; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 126 и 70; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128 и 72; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 932, 164 и 1644; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 934, 166 и 1646; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 936, 168 и 1648.

Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против PCMA согласно настоящему изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3, содержащий тяжелую цепь, которая содержит каркасные участки переменного домена, имеющие аминокислотную последовательность, которая выбрана из FR1 (SEQ ID NO: 1654), FR2 (SEQ ID NO: 1656), FR3 (SEQ ID NO: 1657) и FR4 (SEQ ID NO: 1658).

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против PCMA согласно настоящему изобретению включают биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит HCVR, содержащую HCDR1-HCDR2-HCDR3, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1659-1660-1661.

В настоящем изобретении также предложены биспецифичные молекулы против CD3/против PCMA, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122 и 138, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены биспецифичные молекулы против CD3/против PCMA, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 930, 162 и 1642, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

В настоящем изобретении также предложены биспецифичные молекулы против CD3/против PCMA, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122/930, 122/162 и 66/1642.

В настоящем изобретении также предложены биспецифичные молекулы против CD3/против PCMA, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 и 144, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 936, 168 и 1648, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128/936, 128/168 и 72/1648.

В настоящем изобретении также предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против PCMA, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 116, 124 и 140, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 102, 110, 118, 126 и 142, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 и 144, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по мень-

шей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 932, 164 и 1644, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 934, 166 и 1646, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 936, 168 и 1648, или последовательность, по существу подобную указанной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, которые выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124-126-128-932-934-936, 124-126-128-164-166-168 и 68-70-72-1644-1646-1648.

Согласно близкому варианту реализации настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, которые содержатся в последовательностях варибельной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122/930, 122/162 и 66/1642.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает ПСМА человека, причем второй антигенсвязывающий домен получен из антитела или антигенсвязывающего фрагмента любого из антител против ПСМА согласно настоящему изобретению. Согласно следующему аспекту настоящее изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА человека.

В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая связывается с клетками человека, экспрессирующими CD3 человека, и клетками яванского макака, экспрессирующими CD3 яванского макака.

Согласно другому аспекту биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с клетками человека, экспрессирующими ПСМА человека, и клетками яванского макака, экспрессирующими ПСМА яванского макака.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая ингибирует рост опухоли у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая ингибирует рост опухоли у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая подавляет опухолевый рост развившихся опухолей у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. В настоящем изобретении также предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая снижает опухолевый рост развившихся опухолей у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая i) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с эффекторной клеткой со значением  $EC_{50}$  более приблизительно 40 нМ, и ii) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с клеткой-мишенью опухоли предстательной железы человека со значением  $EC_{50}$  менее 40 нМ, причем такое значение аффинности связывания  $EC_{50}$  измеряют в анализе связывания методом FACS in vitro.

Например, биспецифичная антигенсвязывающая молекула может содержать первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека со значением  $EC_{50}$  более приблизительно 40 нМ или более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 200 нМ или более приблизительно 1 мкМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула может содержать второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с клеткой-мишенью опухоли предстательной железы со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 6 нМ. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен специфично связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со значением  $EC_{50}$  более приблизительно 40 нМ, более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 200 нМ или более приблизительно 1 мкМ. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен специфично связывается с CD3 человека со значением  $EC_{50}$  более приблизительно 40 нМ, более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 200 нМ или более приблизительно 1 мкМ.

зывающий домен специфично связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со слабой аффинностью или с отсутствием измеряемой аффинности.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула вызывает опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 1,3 нМ, которое измеряют в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, например когда опухолевые клетки представляют собой клетки C4-2, 22Rv1 и TRAMPC2\_P SMA.

Согласно некоторым вариантам применения первый антигенсвязывающий домен связывает CD3 человека со значением  $K_D$  более приблизительно 11 нМ, которое измеряют в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса *in vitro*. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со значением  $K_D$  более приблизительно 15 нМ, более приблизительно 30 нМ, более приблизительно 60 нМ, более приблизительно 120 нМ или более приблизительно 300 нМ, которое измеряют в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса *in vitro*.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела против CD3 согласно настоящему изобретению, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител были получены посредством замены аминокислотных остатков родительских вариантов поэтапным способом на основании различий между зародышевой последовательностью и последовательностью родительского антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с ПСМА человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит три участка, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три участка, определяющих комплементарность, легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), причем A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124 и 68; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 126 и 70; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128 и 72; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164, 932 и 1644; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 166, 934 и 1646; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168, 936 и 1648. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с ПСМА человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит варируемую область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122 и 66, и варируемую область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 162, 930 и 1642.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит три участка, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три участка, определяющих комплементарность, легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 924, 156, 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620 и 1628; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622 и 1630; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624 и 1632; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164, 932 и 1644; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 166, 934 и 1646; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168, 936 и 1648. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит варируемую область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506, 1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 и 1626, и варируемую область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 930, 162 и 1642.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена биспецифичная антигенсвязывающая молекула, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связыва-

ние с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506, 1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 и 1626, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 930, 162 и 1642; и в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с ПСМА человека с эталонным антигенсвязывающим белком, который содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122 и 66, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 930, 162 и 1642.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу против ПСМА или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против ПСМА/против CD3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу против ПСМА или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против ПСМА/против CD3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака и рака желудка. В некоторых случаях рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых случаях рак предстательной железы представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR биспецифичных антигенсвязывающих молекул против CD3/против ПСМА, раскрытых в настоящем описании, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в табл. 2, 13, 15, 17, 19 и 21 настоящего документа, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более из полинуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 2, 13, 15, 17, 19 и 21, в любой функциональной комбинации или конфигурации указанных последовательностей. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, и клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, также включены в настоящее изобретение, как и способы получения антител посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих получение антител, и выделения полученных антител.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, в которых любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связываются с CD3, объединен, присоединен или иным способом связан с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связываются с ПСМА, с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая связывается с CD3 и ПСМА.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, содержащие модифицированный паттерн гликозилирования. Согласно некоторым вариантам применения модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, в котором отсутствует группа фукозы на олигосахаридной цепи, могут являться подходящими, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. публикацию Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Согласно другим вариантам применения модификацию галактозилирования можно осуществить с целью модификации комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD3/против ПСМА, раскрытую в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно близкому аспекту в настоящем изобретении описана композиция, которая представляет собой комбинацию биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое с пользой объединяют с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой против CD3/против ПСМА. Иллюстративные средства, которые можно с пользой объединить с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой против CD3/против ПСМА, подробно обсуждаются в другом месте настоящего описания.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены терапевтические способы нацеливания на опухолевые клетки/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих ПСМА, с применением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом.

Настоящее изобретение также включает применение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению при изготовлении медицинского пре-

парата для лечения заболевания или нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими ПСМА, или вызванного данными клетками.

Другие варианты реализации настоящего изобретения являются очевидными из обзора последующего подробного описания.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 иллюстрирует, что биспецифичное антитело против ПСМАх CD3 ингибирует рост линии клеток предстательной железы человека *in vivo*. Мышам NSG подкожно совместно имплантировали клетки 22Rv1 и МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) человека. Животным *и.п.* (интраперитонеально) вводили дозу 1 мкг биспецифичных антител против ПСМАх CD3 в совокупности три раза в дни 0, 3 и 7. Данные выражали в виде среднего значения (СОС, стандартная ошибка среднего) и анализировали с применением дисперсионного анализа (ANOVA).

Фиг. 2А-Д демонстрируют, что лечение биспецифичным антителом против ПСМАх CD3 вызывает временное дозозависимое повышение уровня циркулирующих цитокинов, когда уровни цитокинов (интерферона-гамма, ИФН $\gamma$ ; фактора некроза опухоли, ФНО; интерлейкина-2, ИЛ-2; и интерлейкина-6, ИЛ-6) исследовали через 4 ч после лечения.

Фиг. 3А, В иллюстрируют, что лечение биспецифичным антителом против ПСМАх CD3 на гуманизированных Т-клетках мыши (100 мкг/мышь) вызывает резкое повышение уровня цитокинов (например, ИФН $\gamma$ ) (фиг. 3А), а также временное снижение уровня циркулирующих Т-клеток (фиг. 3В).

Фиг. 4А-С иллюстрируют эффект биспецифичных антител против ПСМАх CD3 в отношении эффекторных Т-клеток в селезенке мышей без иммунодефицита.

#### **Подробное описание изобретения**

Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поэтому способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен исключительно прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те значения, которые общепринято понимаются средним специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В настоящем документе термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного указанного цифрового значения означает, что данное значение может варьировать относительно указанного значения на не более 1%. Например, в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения, находящиеся между указанными значениями (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то, что при реализации на практике или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в настоящем документе, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в данном описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

#### **Определения**

Выражение "CD3" в настоящем документе означает антиген, который экспрессируется на Т-клетках в качестве части мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (ТКР) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного в результате объединения двух из четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1649; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1650. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе предназначены для обозначения версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка человека, если однозначно не указано, что таковые получены из видов, отличных от человека. Таким образом, выражение "CD3" означает CD3 человека, если не указано, что данный белок получен из видов, отличных от человека, например "CD3 мыши", "CD3 обезьяны" и т.д.

В настоящем документе "антитело, которое связывается с CD3", или "антитело против CD3" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают одну субъединицу CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают димерный комплекс двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связываться с растворимым CD3 и/или с CD3, экспрессируемым на поверхности клетки. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также рекомбинантные варианты белка CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые в результате других причин не являются связанными с мембраной клетки.

В настоящем документе выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки", означает один

или более белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, в результате чего по меньшей мере часть белка CD3 экспонируется на внеклеточной стороне мембраны клетки и является доступной для антигенсвязывающей части антитела. "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки", включает белки CD3, содержащиеся в пределах контекста функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки", включает белок CD3, экспрессируемый в виде части гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки", также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе, без других типов цепей CD3, на поверхности клетки. "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессированного на поверхности клетки, которая в норме экспрессирует белок CD3. В качестве альтернативы "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессированного на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует на своей поверхности CD3 человека, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD3 на своей поверхности.

Выражение "PCMA" в настоящем документе означает простатспецифический мембранный антиген, также известный как фолатгидролаза 1 (FOLH1). PCMA представляет собой интегральный, не поддающийся шеддингу гликопротеин мембраны, который в высокой степени экспрессируется в эпителиальных клетках предстательной железы и является маркером клеточной поверхности рака предстательной железы. Аминокислотная последовательность PCMA человека представлена в SEQ ID NO: 1651.

В настоящем документе "антитело, которое связывается с PCMA", или "антитело против PCMA" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают PCMA.

Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

Термин "антитело" в настоящем документе означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), который специфично связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, PCMA или CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями, а также мультимеры указанных молекул (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначается в настоящем документе как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначается в настоящем документе как LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L</sub>1). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются участками, являющимися более консервативными, которые называют каркасными участками (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения FR антитела против PCMA или антитела против CD3 (или антигенсвязывающей части указанного антитела) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут являться модифицированными природным или искусственным способом. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить с применением параллельного анализа двух или нескольких CDR.

Термин "антитело" в настоящем документе также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. в настоящем документе включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным способом, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антитела с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные генно-инженерные методики, включающие манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей переменный и необязательно константный домены антитела. Такая ДНК известна и/или ее легко можно получить, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включая, например, фаговые библиотеки антител) либо можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и подвергнуть химической манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такой как пептид CDR3), или напряженный пептид FR3-CDR3-FR4.

Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с перенесенными CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), небольшие модулярные иммунофармацевтические средства (small modular immunopharmaceuticals, SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включены в настоящем документе в выражение "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или составом аминокислот и, как правило, содержит по меньшей мере один CDR, который прилегает к одной или более кармашным последовательностям или находится в рамке с указанными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен  $V_H$ , связанный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут находиться в любом подходящем расположении друг относительно друга. Например, вариабельная область может являться димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельного и константного доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают (i)  $V_H$ - $C_H1$ ; (ii)  $V_H$ - $C_H2$ ; (iii)  $V_H$ - $C_H3$ ; (iv)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (v)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vi)  $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vii)  $V_H$ - $C_L$ ; (viii)  $V_L$ - $C_H1$ ; (ix)  $V_L$ - $C_H2$ ; (x)  $V_L$ - $C_H3$ ; (xi)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (xii)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (xiii)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; и (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . В любой конфигурации вариабельного и константного доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариабельный и константный домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к получению подвижной или полуподвижной связи между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, за счет дисульфидной связи или связей).

Как и в случае полных молекул антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два различных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен к специфичному связыванию с отдельным антигеном или с отличным эпитопом на том же антигене. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая иллюстративные форматы биспецифичного антитела, раскрытые в настоящем документе, можно приспособить для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с применением общепринятых методик, доступных в данной области техники.

Антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать по механизму комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). "Комплементзависимая цитотоксичность" (КЗЦ) означает лизис антиген-экспрессирующих клеток антителом согласно настоящему изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) означает опосредованную клетками реакцию, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки-природные киллеры (natural killer, NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и за счет этого приводят к лизису клетки-мишени. КЗЦ и АЗКЦ можно измерять с применением анализов, хорошо известных и доступных в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5,500,362 и 5,821,337 и публикацию Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела является важной для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела можно выбрать в зависимости от того, целесообразно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения моноспецифичные антитела против ПСМА или биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 согласно настоящему изобретению представляют собой антитела человека. Термин "антитело человека" в настоящем документе включает антитела, содержащие вариабельную и константную области, полученные из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулина человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями зародышевой линии иммуноглобулина человека (например, мутации, введенные в результате рандомного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или в результате соматических мутаций *in vivo*), например в CDR, и в частности в CDR3. Однако термин "антитело человека" в настоящем документе не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млеко-

питающих, таких как мышь, были перенесены в каркасные последовательности человека.

Антитела по изобретению согласно некоторым вариантам реализации могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Термин "рекомбинантное антитело человека" в настоящем документе включает все антитела человека, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, которым была трансфицирована клетка-хозяин (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, публикацию Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельную и константную области, полученные из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулина человека. Однако согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда применяют последовательности животного, трансгенного в отношении Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя и получены из последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека и относятся к данным последовательностям, могут не существовать в природе в пределах репертуара зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые обусловлены гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелых цепей. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула приблизительно 75-80 кДа, которая состоит из ковалентно соединенных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Данные формы чрезвычайно тяжело выделить даже после аффинной очистки.

Частота возникновения второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена без ограничений структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна замена аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может в значительной степени снизить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, как правило, наблюдаемых при применении шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение включает антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнирной области, областях  $C_H2$  или  $C_H3$ , которые могут быть целесообразными, например, при разработке, для улучшения выхода целевой формы антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. "Выделенное антитело" в настоящем документе означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое отделено или удалено по меньшей мере от одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело существует в природе или образуется в природе, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела являются антителами, которые подвергли по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Настоящее изобретение также включает одноплечевые антитела, которые связываются с ПСМА. В настоящем документе "одноплечевое антитело" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1.

Антитела против ПСМА или против ПСМА/против CD3, раскрытые в настоящем документе, могут содержать одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных участках и/или участках CDR вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены данные антитела. Такие мутации можно с легкостью выявить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, которые можно получить, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одну или более аминокислот в пределах одного или более каркасных участков и/или участков CDR мутировали к соответствующему остатку или остаткам последовательности зародышевой линии, из которой было получено данное антитело, или к соответствующему остатку или остаткам другой последовательности зародышевой линии человека, или к консервативной замене аминокислоты соответствующего остатка или остатков зародышевой линии (такие изменения последова-

тельности в совокупности обозначаются в настоящем документе как "мутации зародышевой линии"). Средний специалист в данной области техники, начиная с последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, может с легкостью получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или комбинации указанных мутаций. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения все из каркасных остатков и/или остатков CDR в пределах доменов  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения лишь несколько остатков мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, лишь мутированные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или лишь мутированные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутируют к соответствующему остатку или остаткам отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было изначально получено антитело). Более того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных участков и/или участков CDR, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют к соответствующему остатку конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют к соответствующему остатку отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно с легкостью исследовать в отношении одного или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные данным общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антитела против PCMA или против PCMA/против CD3, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, которые содержат одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела против PCMA или против PCMA/против CD3, содержащие 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 заменами аминокислот относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1 настоящего документа или описанных в табл. 12, 14, 15, 18 и 20 настоящего документа.

Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфичным антигенсвязывающим сайтом в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут являться конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками полипептидной цепи. При определенных обстоятельствах эпитоп может содержать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или фрагменте указанной нуклеиновой кислоты, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность последовательности нуклеотидов составляет по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, что измеряют с применением любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая характеризуется существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, содержащий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

При применении в отношении полипептидов термин "существенное подобие" или "по существу подобный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например с применением программ GAP или BESTFIT с применением штрафа за открытие пропуска по умолчанию, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно, идентичностью последовательности по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными заменами аминокислот. "Консервативная замена аминокислоты" является таковой, в которой остаток аминокислоты заменен

другим остатком аминокислоты, который содержит боковую цепь (R-группу) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная замена аминокислоты по существу не изменяет функциональных свойств белка. В случаях когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень подобия можно откорректировать в сторону повышения для коррекции консервативной природы замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи с подобными 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) щелочные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы для консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Подобие последовательностей полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет схожие последовательности, используя показатели подобия, заданные для различных замен, делеций и других модификаций, в том числе консервативных аминокислотных замен.

Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут использоваться вместе с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнить, используя FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программу в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает совмещения и процент идентичности последовательностей участков наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), ссылка выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки.

#### Мутации зародышевой линии

Антитела против CD3, раскрытые в настоящем документе, содержат одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены данные антитела.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одну или более аминокислот в пределах одного или более каркасных участков и/или участков CDR мутируют к соответствующему остатку или остаткам последовательности зародышевой линии, из которой было получено данное антитело, или к соответствующему остатку или остаткам другой последовательности зародышевой линии человека, или к консервативной замене аминокислоты соответствующего остатка или остатков зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности обозначаются в настоящем документе как "мутации зародышевой линии"), и которые характеризуются слабым связыванием или отсутствием обнаруживаемого связывания с антигеном CD3. Некоторые такие иллюстративные антитела, которые распознают CD3, описаны в табл. 12 и 18 в настоящем документе.

Более того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных участков и/или участков CDR, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют к соответствующему остатку конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют к соответствующему остатку отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно с легкостью исследовать в отношении одного или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увели-

ченная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), сниженная иммуногенность и т.д. Антигена и антигенсвязывающие фрагменты, полученные данным общим способом с учетом руководства настоящего раскрытия, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антитела против CD3, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, которые содержат одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела против CD3, которые содержат 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 заменами аминокислот относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 12, 14, 15, 18 и 20 настоящего документа. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены индивидуальные антигенсвязывающие домены, с сохранением или улучшением желаемого от слабого связывания до отсутствия обнаруживаемого связывания с антигеном CD3. "Консервативная замена аминокислоты" является таковой, в которой остаток аминокислоты заменен другим остатком аминокислоты, который содержит боковую цепь (R-группу) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная замена аминокислоты по существу не изменяет функциональных свойств белка, т.е. замена аминокислоты сохраняет или улучшает желаемую от слабой аффинности связывания до отсутствия обнаруживаемой аффинности связывания в случае связывающей молекулы против CD3. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) щелочные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы для консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании, с поддержанием или улучшением желаемой слабой аффинности в отношении антигена CD3. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет об аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например посредством программ GAP или BESTFIT с применением штрафа за открытие пропуска по умолчанию, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно идентичностью последовательности по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными заменами аминокислот. В случаях когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень подобия можно откорректировать в сторону повышения для коррекции консервативной природы замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

Подобие последовательностей полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет схожие последовательности, используя показатели подобия, заданные для различных замен, делеций и других модификаций, в том числе консервативных аминокислотных замен. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы как Gap и Bestfit, которые могут использоваться вместе с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнить, используя FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программу в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает совмещения и процент идентичности последовательностей участков наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), ссылка выше). Другим предпочтитель-

ным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.

После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, исследовали в отношении сниженной аффинности связывания с применением одного или более анализов *in vitro*. Несмотря на то, что, как правило, для своих целей проводят скрининг антител, которые распознают конкретный антиген, посредством исследования в отношении высокой (т.е. сильной) аффинности связывания с антигеном, антитела согласно настоящему изобретению демонстрируют слабое связывание или отсутствие обнаруживаемого связывания. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученные данным образом, также включены в настоящее изобретение и, как было обнаружено, являются предпочтительными в качестве вариантов терапии опухолей, запускаемых авидностью.

Способы, описанные в настоящем документе, позволяют получить неожиданные преимущества, например улучшенные свойства фармакокинетики и низкую токсичность в отношении пациента.

#### Свойства связывания антител

В настоящем документе термин "связывание" в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка, например, с predetermined антигеном, таким как белок поверхности клетки или его фрагмент, как правило, означает взаимодействие или ассоциацию между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, такое как взаимодействие антитело-антиген.

Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению  $K_D$  приблизительно  $10^{-7}$  М или менее, например приблизительно  $10^{-8}$  М или менее, такому как приблизительно  $10^{-9}$  М или менее, при определении, например, с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе BIAcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антилиганда). Также общепринято используют стратегии связывания с применением клеток, такие как анализы связывания методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (fluorescent-activated cell sorting, FACS), и данные метода FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолганда и ППР (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1991, 201 (2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302 (1-2):68-77).

Соответственно антитело или антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с predetermined антигеном или молекулой поверхности клетки (рецептором), характеризующая аффинностью, соответствующей значению  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем аффинность указанного антитела или белка при связывании с неспецифичным антигеном (например, БСА (бычий сывороточным альбумином), казеином). Согласно настоящему изобретению аффинность антитела, которая соответствует значению  $K_D$ , равному или менее чем в десять раз меньшему, чем аффинность к неспецифичному антигену, можно считать необнаруживаемым связыванием, однако такое антитело можно спарить со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению.

Термин " $K_D$ " (М) означает равновесную константу диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесную константу диссоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела с антигеном. Существует обратная зависимость между  $K_D$  и аффинностью связывания, вследствие этого, 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 образованию взаимодействия и вследствие этого к меньшему значению  $K_D$ , и наоборот: термины "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к меньшей способности к образованию взаимодействия и вследствие этого к большему значению  $K_D$ . При определенных обстоятельствах более высокая аффинность связывания (или  $K_D$ ) конкретной молекулы (например, антитела) с молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном Y), может быть выражена в виде соотношения связывания, которое определяют посредством деления большего значения  $K_D$  (более низкая или слабая аффинность) на меньшее  $K_D$  (более высокая или сильная аффинность), например, может быть выражена как в 5 раз или в 10 раз большая аффинность связывания в зависимости от конкретного случая.

Термин " $k_d$ " (сек.<sup>-1</sup> или 1/с) означает константу скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константу скорости диссоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Указанное значение также называют значением  $k_{off}$ .

Термин " $k_a$ " (М<sup>-1</sup>×сек.<sup>-1</sup> или 1/М) означает константу скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константу скорости ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела.

Термин " $K_A$ " ( $M^{-1}$  или  $l/M$ ) означает равновесную константу ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесную константу ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Равновесную константу ассоциации получают посредством деления  $k_a$  на  $k_d$ .

Термин " $EC_{50}$ " или " $EC_{50}$ " означает половину максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, вызывающую половину ответа между исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия.  $EC_{50}$  по существу представляет собой концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% от максимального эффекта антитела. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения значение  $EC_{50}$  равно концентрации антитела согласно настоящему изобретению, которая обеспечивает половину максимального связывания с клетками, экспрессирующими CD3 или опухоль-ассоциированный антиген, которую определяют, например, в анализе связывания методом FACS. Таким образом, с увеличением значения  $EC_{50}$  или половины максимальной эффективной концентрации наблюдается сниженное или более слабое связывание.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сниженное связывание можно определить как увеличенную концентрацию  $EC_{50}$  антитела, которая обеспечивает связывание с половиной от максимального количества клеток-мишеней.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения значение  $EC_{50}$  представляет собой концентрацию антитела согласно настоящему изобретению, которая вызывает половину максимального истощения клеток-мишеней в результате цитотоксической активности Т-клеток. Таким образом, увеличение цитотоксической активности (например, опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток) наблюдается со снижением значения  $EC_{50}$  или половины максимальной эффективной концентрации.

#### Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут являться специфичными к отличным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Моноспецифичные антитела против ПСМА или биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 согласно настоящему изобретению могут быть связаны или могут коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент можно функционально связать (например, химическим сочетанием, генетическим слиянием, нековалентным связыванием или иным способом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

Использование выражения "антитело против CD3" или "антитело против ПСМА" в настоящем документе включает моноспецифичные антитела против CD3 или против ПСМА, а также биспецифичные антитела, содержащие CD3-связывающее плечо и ПСМА-связывающее плечо. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывается с CD3 человека, а второе плечо иммуноглобулина специфично к ПСМА человека. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 12, 14, 15, 18 и 20.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения CD3-связывающее плечо связывается с CD3 человека и вызывает активацию Т-клеток человека. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и вызывает активацию Т-клеток человека. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и вызывает уничтожение опухоль-ассоциированной антиген-экспрессирующей клетки в контексте биспецифичного или мультиспецифичного антитела. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения CD3-связывающее плечо слабо связывается или ассоциирует с CD3 человека и яванского макака (обезьяны), однако взаимодействие связывания является необнаруживаемым анализами *in vitro*, известными в данной области техники. ПСМА-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1 настоящего документа.

Согласно определенным иллюстративным вариантам реализации настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают CD3 и ПСМА. Такие молекулы могут называться в настоящем документе, например, биспецифичными молекулами "против CD3/против ПСМА", или "против CD3хПСМА", или "CD3хПСМА", либо с применением другой подобной терминологии (например, против ПСМА/против CD3).

Термин "ПСМА" в настоящем документе означает белок ПСМА человека, если не указано, что данный белок получен из видов, отличных от человека (например, "ПСМА мыши", "ПСМА обезьяны" и т.д.). Белок ПСМА человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1651.

Вышеупомянутые биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают CD3 и ПСМА, могут содержать антигенсвязывающую молекулу против CD3, которая связывается с CD3 со слабой аффинностью связывания, с  $K_D$  более приблизительно 40 нМ, согласно измерению в ана-

лизе аффинности связывания *in vitro*.

В настоящем документе выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий из по меньшей мере одного участка, определяющего комплементарность (CDR), который сам по себе или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или каркасными участками (FR) специфично связывается с конкретным антигеном. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как данные термины определены в другом месте настоящего описания.

В настоящем документе выражение "биспецифичная антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий, по меньшей мере, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в пределах биспецифичной антигенсвязывающей молекулы содержит по меньшей мере один CDR, который сам по себе или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или FR специфично связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфично связывается с первым антигеном (например, CD3) и второй антигенсвязывающий домен специфично связывается со вторым отличным антигеном (например, PCMA).

Согласно определенным иллюстративным вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVR) и вариабельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающие домены (например, биспецифичное антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены приставкой "A1", и CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены приставкой "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть напрямую или опосредованно соединены друг с другом с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена может быть присоединен к отдельному мультимеризирующему домену. Связывание одного мультимеризирующего домена с другим мультимеризирующим доменом облегчает связывание между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифичную антигенсвязывающую молекулу. В настоящем документе "мультимеризирующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая обладает способностью связываться со вторым мультимеризирующим доменом такой же или подобной структуры или строения. Например, мультимеризирующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина. Неограничивающий пример мультимеризирующего компонента представляет собой Fc-часть иммуноглобулина (содержащую домен C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3), например Fc-домен IgG, который выбран из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в пределах каждой группы изоформ.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат два мультимеризирующих домена, например два Fc-домена, каждый из которых в отдельности представляет собой часть отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризирующий домены могут относиться к одному изоформе IgG, такому как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В качестве альтернативы первый и второй мультимеризирующий домены могут относиться к различным изоформам IgG, таким как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения мультимеризирующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность от 1 до приблизительно 200 аминокислот в длину, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения мультимеризирующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризирующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали.

Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению можно применять любой формат или технологию биспецифичного антитела. Например, антитело или его фрагмент, которое характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном, можно функционально связать (например, посредством химического сочетания, генетического слияния, нековалентного связывания или иным способом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, которое характеризуется специфичностью связывания со вторым антигеном, с получением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные примеры биспецифичных форматов, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, двой-

ной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступ-во-впадину, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступом-во-впадину, и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и биспецифичные форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, обзор вышеупомянутых форматов в Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и в источниках, ссылки на которые приведены в указанной публикации).

В контексте биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению мультимеризирующие домены, например Fc-домены, могут содержать одно или более изменений аминокислот (например, вставок, делеций или замен) по сравнению с версией Fc-домена дикого типа, встречающейся в природе. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, которые приводят к получению модифицированного Fc-домена, который характеризуется модифицированным взаимодействием связывания (например, усиленным или ослабленным) между Fc и FcRn. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, причем модификация увеличивает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 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 положении 428, и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту реализации настоящего 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 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C<sub>H</sub>3 и второй домен C<sub>H</sub>3 Ig, причем первый и второй домены C<sub>H</sub>3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и причем отличие по меньшей мере на одну аминокислоту снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, в котором отсутствует различие аминокислот. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первый домен C<sub>H</sub>3 Ig связывается с белком А и второй домен C<sub>H</sub>3 Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; H435R, нумерация согласно EU). Второй C<sub>H</sub>3 может также содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., например, патент США № 8586713. Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором C<sub>H</sub>3, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения Fc-домен может являться химерным, сочетающим последовательности Fc, полученные из иммуноглобулинов более чем одного изотипа. Например, химерный Fc-домен может содержать часть или всю последовательность C<sub>H</sub>2, полученную из области C<sub>H</sub>2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность C<sub>H</sub>3, полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный Fc-домен может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, объединенную с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит от N- к С-концу: [IgG4 C<sub>H</sub>1] - [верхний шарнир IgG4] - [IgG2 нижний шарнир] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3]. Другой пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит от N- к С-концу: [IgG1 C<sub>H</sub>1] - [IgG1 верхний шарнир] - [IgG2 нижний шарнир] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3]. Данные и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, описаны в публикации US 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 года, которая полностью включена в настоящее описание. Химерные Fc-домены, содержащие данное общее структурное устройство, и варианты указанных доменов могут характеризоваться измененным связыванием с Fc-рецептором, что в свою очередь оказывает влияние на эффекторную функцию Fc.

Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложена тяжелая цепь антитела, в которой константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по

меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% любой из SEQ ID NO: 1663, SEQ ID NO: 1664, SEQ ID NO: 1665, SEQ ID NO: 1666, SEQ ID NO: 1667, SEQ ID NO: 1668, SEQ ID NO: 1669, SEQ ID NO: 1670, SEQ ID NO: 1671 или SEQ ID NO: 1672. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1663, SEQ ID NO: 1664, SEQ ID NO: 1665, SEQ ID NO: 1666, SEQ ID NO: 1667, SEQ ID NO: 1668, SEQ ID NO: 1669, SEQ ID NO: 1670, SEQ ID NO: 1671 и SEQ ID NO: 1672.

Согласно другим вариантам реализации в настоящем изобретении предложена тяжелая цепь антитела, в которой Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% любой из SEQ ID NO: 1673, SEQ ID NO: 1674, SEQ ID NO: 1675, SEQ ID NO: 1676, SEQ ID NO: 1677, SEQ ID NO: 1678, SEQ ID NO: 1679, SEQ ID NO: 1680, SEQ ID NO: 1681 или SEQ ID NO: 1682. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1673, SEQ ID NO: 1674, SEQ ID NO: 1675, SEQ ID NO: 1676, SEQ ID NO: 1677, SEQ ID NO: 1678, SEQ ID NO: 1679, SEQ ID NO: 1680, SEQ ID NO: 1681 и SEQ ID NO: 1682.

#### Варианты последовательности

Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены индивидуальные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно с легкостью выявить посредством сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, которые можно получить, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, полученные из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в которых одну или более аминокислот в пределах одного или более каркасных участков и/или участков CDR мутируют к соответствующему остатку или остаткам последовательности зародышевой линии, из которой было получено данное антитело, или к соответствующему остатку или остаткам другой последовательности зародышевой линии человека, или к консервативной замене аминокислоты соответствующего остатка или остатков зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности обозначаются в настоящем документе как "мутации зародышевой линии"). Средний специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, может с легкостью получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или комбинации указанных мутаций. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения все из каркасных остатков и/или остатков CDR в пределах доменов V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub> мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения лишь несколько остатков мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, лишь мутированные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или лишь мутированные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутируют к соответствующему остатку или остаткам отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был изначально получен антигенсвязывающий домен). Более того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных участков и/или участков CDR, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют к соответствующему остатку конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют к соответствующему остатку отличной последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающих доменов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно с легкостью исследовать в отношении одного или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), сниженная иммуногенность и т.д.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных данным общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании, которые содержат одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержа-

щие антигенсвязывающий домен, который содержит 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 заменами аминокислот относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, в которой остаток аминокислоты заменен другим остатком аминокислоты, имеющим боковую цепь (R-группу) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная замена аминокислоты по существу не изменяет функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи с подобными 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) щелочные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы для консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая является по существу идентичной любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет об аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например посредством программ GAP или BESTFIT с применением штрафа за открытие пропуска по умолчанию, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно идентичностью последовательности по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными заменами аминокислот. В случаях когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень подобия можно откорректировать в сторону повышения для коррекции консервативной природы замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Подобие последовательностей полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет схожие последовательности, используя показатели подобия, заданные для различных замен, делеций и других модификаций, в том числе консервативных аминокислотных замен. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут использоваться вместе с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнить, используя FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программу в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает совмещения и процент идентичности последовательностей участков наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), ссылка выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки.

#### рН-зависимое связывание

Настоящее изобретение включает антитела против ПСМА и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело против ПСМА согласно настоящему изобретению может демонстрировать сниженное связывание с ПСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. В качестве альтернативы антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению могут демонстрировать усиленное связывание с ПСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение "кислый рН" включает значения рН менее приблизительно 6,2, например приблизительно 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. В настоящем документе выражение "нейтральный рН"

означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный рН" включает значения приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В определенных случаях "сниженное связывание... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" выражено в виде соотношения значения  $K_D$  связывания антитела с его антигеном при кислом рН к значению  $K_D$  связывания антитела с его антигеном при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие "сниженное связывание с ПСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует соотношение  $K_D$  кислый/нейтральный приблизительно 3,0 или более. Согласно определенным иллюстративным вариантам реализации настоящего изобретения соотношение  $K_D$  кислый/нейтральный антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 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.

Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания можно получить, например, посредством скрининга популяции антител в отношении сниженного (или усиленного) связывания с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Дополнительно модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот позволяют получить антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, замена одной или более аминокислот в антигенсвязывающем домене (например, в пределах CDR) остатком гистидина позволяет получить антитело со сниженным связыванием антигена при кислом рН относительно нейтрального рН.

#### Антитела, содержащие варианты Fc

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения предложены антитела против ПСМА и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, которые содержат Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с рецептором FcRn, например при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 Fc-домена, причем мутация или мутации увеличивают аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полувыведения антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 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 положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 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).

Например, настоящее изобретение включает антитела против ПСМА и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, которые содержат Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, которые выбраны из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и другие мутации в пределах переменных доменов антител, раскрытых в настоящем описании, предусмотрены в пределах объема настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул

Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ПСМА человека с высокой аффинностью (например, с субнаномолярными значениями  $K_D$ ).

Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают ПСМА человека (например, при температуре 37°C) с  $K_D$  менее приблизительно 80 нМ, которую измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например с применением формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают ПСМА с  $K_D$  менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 800 пМ, менее приблизительно 600 пМ, менее приблизительно 500 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 300 пМ, менее приблизительно 200 пМ, менее приблизительно 180 пМ, менее приблизительно 160 пМ, менее приблизительно 140 пМ, менее приблизительно 120 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 80 пМ, менее приблизительно 60 пМ, менее приблизительно 40 пМ, менее приблизительно 20 пМ или менее приблизительно 10 пМ, которую измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа

(например, формата захвата моноклонального антитела или захвата антигена), или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ПСМА с диссоциационным периодом полувыведения ( $t^{1/2}$ ) более приблизительно 1 мин или более приблизительно 10 мин, который измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C, например, с применением формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или по существу подобного анализа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают ПСМА с  $t^{1/2}$  более приблизительно 20 мин, более приблизительно 30 мин, более приблизительно 40 мин, более приблизительно 50 мин, более приблизительно 60 мин, более приблизительно 70 мин, более приблизительно 80 мин, более приблизительно 90 мин, более приблизительно 100 мин, более приблизительно 200 мин, более приблизительно 300 мин, более приблизительно 400 мин, более приблизительно 500 мин, более приблизительно 600 мин, более приблизительно 700 мин, более приблизительно 800 мин, более приблизительно 900 мин, более приблизительно 1000 мин или более приблизительно 1100 мин, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C, например с применением формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа (например, формата захвата моноклонального антитела или захвата антигена), или по существу подобного анализа. Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), которые способны к одновременному связыванию с CD3 человека и ПСМА человека. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению специфично взаимодействуют с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или ПСМА. Степень, в которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или ПСМА, можно оценить методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 5 настоящего описания. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связываются с линиями Т-клеток человека, которые экспрессируют CD3 (такие линии клеток не экспрессируют ПСМА, например, Юркат), и/или с линиями человека, которые экспрессируют ПСМА (такие линии клеток не экспрессируют CD3, например, B16F10.9/hPSMA или 22RV1). Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с любыми из вышеупомянутых клеток и линий клеток со значением  $EC_{50}$  приблизительно 80 нМ или менее, которое определяют с применением анализа FACS, представленного в примере 5, или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, которые связываются с Т-клетками человека, экспрессирующими CD3 (например, Юркат), и/или клетками, экспрессирующими ПСМА, со значением  $EC_{50}$  между 1,0 пМ и 1000 нМ. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА связываются с Т-клетками человека, экспрессирующими CD3, со значением  $EC_{50}$  между 1 нМ и 60 нМ. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, которые связываются с Т-клетками человека, экспрессирующими CD3 (например, Юркат), и/или клетками, экспрессирующими ПСМА, со значением  $EC_{50}$  приблизительно 1 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 20 нМ, приблизительно 30 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 90 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 300 нМ, приблизительно 500 нМ, приблизительно 800 нМ, приблизительно 1000 нМ или более.

Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, демонстрирующие одну или более характеристик, которые выбраны из группы, состоящей из (а) ингибирования роста опухоли у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; (b) ингибирования роста опухоли у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; (с) подавления опухолевого роста развившихся опухолей у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; и (d) снижения опухолевого роста развившихся опухолей у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека (см., например, пример 8).

Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных свойств нацеливания, которые являются целесообразными. Например, в контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывается с CD3, а другое плечо связывается с антигеном-мишенью (например, ПСМА), может являться целесообразным, чтобы плечо, связывающее антиген-мишень, связывалось с антигеном-

мишенью с высокой аффинностью, тогда как плечо против CD3 связывалось с CD3 исключительно с умеренной или низкой аффинностью. В этой связи предпочтительного нацеливания антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, можно достичь с одновременным отсутствием общего/нецелевого связывания с CD3 и последующих нежелательных побочных эффектов, вызванных данным связыванием.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), которые способны к одновременному связыванию с CD3 человека и ПСМА человека. Связывающее плечо, взаимодействующее с клетками, которые экспрессируют CD3, может характеризоваться от слабого связывания до отсутствия обнаруживаемого связывания, что измеряют в подходящем анализе связывания *in vitro*. Степень, с которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или ПСМА, можно оценить методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 5 настоящего документа.

Например, настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые специфично связываются с линиями Т-клеток человека, которые экспрессируют CD3, но не экспрессируют ПСМА (например, Юркат), с Т-клетками приматов (например, мононуклеарными клетками периферической крови [МКПК] яванского макака) и/или с клетками, экспрессирующими ПСМА. Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с любой из вышеупомянутых Т-клеток и линий Т-клеток со значением  $EC_{50}$  от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  (18 нМ) до приблизительно  $2,1 \times 10^{-7}$  (210 нМ) или более (т.е. более слабая аффинность), или  $EC_{50}$  является необнаруживаемой, что определяют с применением анализа связывания методом FACS, представленного в примере 5, или по существу подобного анализа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению связывают CD3 с  $EC_{50}$  более приблизительно 30 нМ, более приблизительно 40 нМ, более приблизительно 45 нМ, более приблизительно 50 нМ, более приблизительно 55 нМ, более приблизительно 60 нМ, более приблизительно 65 нМ, более приблизительно 70 нМ, более приблизительно 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более приблизительно 90 нМ, более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более приблизительно 130 нМ, более приблизительно 140 нМ, более приблизительно 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более приблизительно 170 нМ, более приблизительно 180 нМ, более приблизительно 190 нМ, более приблизительно 200 нМ, более приблизительно 250 нМ, более приблизительно 300 нМ, более приблизительно 1 мкМ, более приблизительно 2 мкМ или более приблизительно 3 мкМ, или обнаруживаемая аффинность отсутствует, что измеряют методом связывания методом FACS, например, с применением формата анализа, описанного в примере 5 настоящего документа, или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые связываются с клетками, экспрессирующими ПСМА, и линиями клеток, со значением  $EC_{50}$ , меньшим или равным  $5,6$  нМ ( $5,6 \times 10^{-9}$ ), которое определяют с применением анализа связывания методом FACS, представленного в примере 5, или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые связывают CD3 человека со слабой (т.е. низкой) аффинностью, или даже обнаруживаемая аффинность отсутствует. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD3 человека (например, при температуре 37°C) с  $K_D$  более приблизительно 11 нМ, которую измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD3 с  $K_D$  более приблизительно 15 нМ, более приблизительно 20 нМ, более приблизительно 25 нМ, более приблизительно 30 нМ, более приблизительно 35 нМ, более приблизительно 40 нМ, более приблизительно 45 нМ, более приблизительно 50 нМ, более приблизительно 55 нМ, более приблизительно 60 нМ, более приблизительно 65 нМ, более приблизительно 70 нМ, более приблизительно 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более приблизительно 90 нМ, более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более приблизительно 130 нМ, более приблизительно 140 нМ, более приблизительно 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более приблизительно 170 нМ, более приблизительно 180 нМ, более приблизительно 190 нМ, более приблизительно 200 нМ, более приблизительно 250 нМ, более приблизительно 300 нМ, более приблизительно 1 мкМ, более приблизительно 2 мкМ или более приблизительно 3 мкМ, или обнаруживаемая аффинность отсутствует, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа (например, формата захвата моноклонального антитела или захвата антигена), или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые связывают CD3 обезьяны (т.е. яванского макака) со слабой (т.е. низ-

кой) аффинностью, или даже обнаруживаемая аффинность отсутствует. Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые связывают CD3 человека (например, при температуре 37°C) с  $K_D$  более приблизительно 10 нМ, которую измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD3 с  $K_D$  более приблизительно 15 нМ, более приблизительно 20 нМ, более приблизительно 25 нМ, более приблизительно 30 нМ, более приблизительно 35 нМ, более приблизительно 40 нМ, более приблизительно 45 нМ, более приблизительно 50 нМ, более приблизительно 55 нМ, более приблизительно 60 нМ, более приблизительно 65 нМ, более приблизительно 70 нМ, более приблизительно 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более приблизительно 90 нМ, более приблизительно 100 нМ, более приблизительно 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более приблизительно 130 нМ, более приблизительно 140 нМ, более приблизительно 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более приблизительно 170 нМ, более приблизительно 180 нМ, более приблизительно 190 нМ, более приблизительно 200 нМ, более приблизительно 250 нМ, более приблизительно 300 нМ, более приблизительно 1 мкМ, более приблизительно 2 мкМ или более приблизительно 3 мкМ, или обнаруживаемая аффинность отсутствует, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа (например, формата захвата моноклонального антитела или захвата антигена), или по существу подобного анализа.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела указанных антител, которые связывают CD3 человека и вызывают активацию Т-клеток. Например, настоящее изобретение включает антитела против CD3, которые вызывают активацию Т-клеток человека со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 113 пМ, что измеряют *in vitro* в анализе активации Т-клеток, например с применением формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа (например, посредством оценки процента активированных (CD69+) клеток от общего количества Т-клеток (CD2+) в присутствии антитела против CD3), или по существу подобного анализа, в котором оценивают Т-клетки в активированном состоянии. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению вызывают активацию Т-клеток человека (например, процент активированных (CD69+) Т-клеток) со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 50 пМ, менее приблизительно 20 пМ, менее приблизительно 19 пМ, менее приблизительно 18 пМ, менее приблизительно 17 пМ, менее приблизительно 16 пМ, менее приблизительно 15 пМ, менее приблизительно 14 пМ, менее приблизительно 13 пМ, менее приблизительно 12 пМ, менее приблизительно 11 пМ, менее приблизительно 10 пМ, менее приблизительно 9 пМ, менее приблизительно 8 пМ, менее приблизительно 7 пМ, менее приблизительно 6 пМ, менее приблизительно 5 пМ, менее приблизительно 4 пМ, менее приблизительно 3 пМ, менее приблизительно 2 пМ или менее приблизительно 1 пМ, что измеряют в анализе активации Т-клеток *in vitro*, например, с применением формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа, или по существу подобного анализа. Антитела против CD3, которые характеризуются слабым связыванием или отсутствием обнаруживаемого связывания с CD3, обладают способностью вызывать активацию Т-клеток с высокой эффективностью (т.е. диапазоном пМ), несмотря на слабое связывание или отсутствие обнаруживаемой аффинности связывания с CD3, что иллюстрируется примером 7 настоящего документа.

Настоящее изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела, которые связывают CD3 человека и вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение антиген-экспрессирующих клеток опухоли. Например, настоящее изобретение включает антитела против CD3, которые вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток с  $EC_{50}$  менее приблизительно 1,3 нМ, что измеряют в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, например, с применением формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа (например, посредством оценки степени уничтожения клеток, экспрессирующих ПСМА, МКПК человека в присутствии антитела против CD3), или по существу подобного анализа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (например, опосредованное МКПК уничтожение клеток C4-2, 22Rv1 и TRAMPC2 PSMA) со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 250 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 50 пМ, менее приблизительно 40 пМ, менее приблизительно 30 пМ, менее приблизительно 20 пМ, менее приблизительно 10 пМ, менее приблизительно 9 пМ, менее приблизительно 8 пМ, менее приблизительно 7 пМ, менее приблизительно 6 пМ, менее приблизительно 5 пМ, менее приблизительно 4 пМ, менее приблизительно 3 пМ, менее приблизительно 2 пМ или менее приблизительно 1 пМ, что измеряют в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, например, с применением формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа, или по существу подобного анализа. Настоящее изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела, которые связывают CD3 человека и/или обезьяны (т.е. яванского макака) со слабой (т.е. низкой) аффинностью, или даже обнаруживаемая аффинность отсутст-

вует (т.е. не связываются или не демонстрируют обнаруживаемой аффинности), и вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих антиген опухоли.

Настоящее изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифичные антитела, которые связывают CD3 с диссоциационным периодом полувыведения ( $t_{1/2}$ ) менее приблизительно 10 мин, который измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C, например с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа, или по существу подобного анализа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD3 с  $t_{1/2}$  менее приблизительно 9 мин, менее приблизительно 8 мин, менее приблизительно 7 мин, менее приблизительно 6 мин, менее приблизительно 5 мин, менее приблизительно 4 мин, менее приблизительно 3 мин, менее приблизительно 2 мин, менее приблизительно 1,9 мин или менее приблизительно 1,8 мин, или демонстрируют очень слабое связывание или отсутствие обнаруживаемого связывания, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C, например с применением формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа (например, формата захвата моноклонального антитела или захвата антигена), или по существу подобного анализа.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению могут дополнительно демонстрировать одну или более характеристик, которые выбраны из группы, состоящей из (а) индукции пролиферации МКПК *in vitro*; (b) активации Т-клеток посредством индукции высвобождения ИФН-гамма и повышающей регуляции CD25 в цельной крови человека; и (с) индукции опосредованной Т-клетками цитотоксичности на линиях клеток, устойчивых к антителам против ПСМА.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, которые способны к истощению антиген-экспрессирующих клеток опухоли у субъекта (см., например, пример 8). Например, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, причем однократное введение 1 мкг, или 10 мкг, или 100 мкг биспецифичной антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг или менее) вызывает снижение количества клеток, экспрессирующих ПСМА, у субъекта (например, рост опухоли у субъекта подавлен или заингибирован) ниже обнаруживаемых уровней. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения однократное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА в дозе приблизительно 0,4 мг/кг вызывает снижение роста опухоли у субъекта ниже обнаруживаемых уровней приблизительно ко дню 7, приблизительно ко дню 6, приблизительно ко дню 5, приблизительно ко дню 4, приблизительно ко дню 3, приблизительно ко дню 2 или приблизительно ко дню 1 после введения субъекту биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения однократное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению в дозе по меньшей мере приблизительно 0,01 мг/кг приводит к тому, что количество экспрессирующих ПСМА опухолевых клеток остается ниже обнаруживаемых уровней вплоть до по меньшей мере приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 дней или более после введения. В настоящем документе выражение "ниже обнаруживаемых уровней" означает, что у субъекта невозможно напрямую или опосредованно обнаружить растущие подкожно опухолевые клетки с применением стандартных способов измерения с помощью циркуля, например, описанных в примере 8 настоящего документа.

Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, демонстрирующие одну или более характеристик, которые выбраны из группы, состоящей из (а) ингибирования роста опухоли у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; (b) ингибирования роста опухоли у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; (с) подавления опухолевого роста развившихся опухолей у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; и (d) снижения опухолевого роста развившихся опухолей у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека (см., например, пример 8). Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА, демонстрирующие одну или более характеристик, которые выбраны из группы, состоящей из (а) индукции временного дозозависимого повышения уровня циркулирующих цитокинов, (b) индукции временного повышения уровня циркулирующих Т-клеток, и (с) отсутствия истощения эффекторных Т-клеток (например, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и регуляторных Т-клеток, т.е. Treg).

Картирование эпитопов и связанные технологии

Эпитоп на CD3 и/или ПСМА, 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 или ПСМА. В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или

аминокислотных последовательностей) CD3 или PCMA. Антитела согласно настоящему 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 различных цепях CD3. Термин "эпитоп" в настоящем документе означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфичным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут являться конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками полипептидной цепи. При определенных обстоятельствах эпитоп может содержать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Для определения того, "взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами" в пределах полипептида или белка, можно использовать различные методики, известные средним специалистам в данной области техники. Примеры методик включают, например, общепринятый анализ перекрестного блокирования, в частности, описанный в руководстве *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ сканированием алаином, пептидный блот-анализ (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно применять способы, такие как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другой способ, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, представляет собой обмен водород/дейтерий, обнаруживаемый масс-спектрометрией. В общем виде способ обмена водород/дейтерий включает мечение белка, представляющего интерес, дейтерием с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить осуществиться обмену водород-дейтерий во всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и анализу методом масс-спектрометрии, что позволяет выявить меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфичным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Для целей картирования эпитопов также можно применять рентгеновскую кристаллографию комплекса антиген/антитело.

Настоящее изобретение также включает антитела против PCMA, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из специфичных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 настоящего документа). Аналогично настоящее изобретение также включает антитела против PCMA, которые конкурируют за связывание с PCMA с любым из специфичных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 настоящего документа).

Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низкой или обнаруживаемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA человека, в которых первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, что и любой из специфичных иллюстративных CD3-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или в которых второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на PCMA, что и любой из специфичных иллюстративных PCMA-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

Аналогично настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PCMA человека, в которых первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из специфичных иллюстративных CD3-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или в которых второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с PCMA с любым из специфичных иллюстративных PCMA-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

Можно легко определить с применением общепринятых способов, известных в данной области техники, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или антигенсвязывающий домен указанной молекулы с тем же эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, или конкурирует ли конкретная антигенсвязывающая молекула за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом на PCMA (или CD3), что и эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, эталонной биспецифичной молекуле сначала позволяют связаться с белком PCMA (или белком CD3). Затем

оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой ПСМА (или CD3). Если исследуемое антитело способно связываться с ПСМА (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, можно заключить, что исследуемое антитело связывается с отличным эпитопом ПСМА (или CD3), чем эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно к связыванию с молекулой ПСМА (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом ПСМА (или CD3), что и эпитоп, связанный эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению. Затем можно провести дополнительные общепринятые эксперименты (например, мутации пептидов и анализ связывания) для подтверждения того, является ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела в действительности следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, или за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает пространственное блокирование (или другой феномен). Эксперименты данного типа можно провести с применением методов ELISA, РИА (радиоиммуноанализа), Вiasoge, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с 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%, что измеряют в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы считают, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все мутации аминокислот в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, снижают или устраняют связывание другого. Два антигенсвязывающих белка считают содержащими "перекрывающиеся эпитопы", только если подмножество мутаций аминокислот, которые снижают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, снижают или устраняют связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, вышеописанную методологию связывания осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации эталонной антигенсвязывающей молекуле дают возможность связаться с белком ПСМА (или белком CD3) при условиях насыщения с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой ПСМА (или CD3). Во второй ориентации исследуемому антителу дают возможность связаться с молекулой ПСМА (или CD3) при условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой ПСМА (или CD3). Если в обеих ориентациях к связыванию с молекулой ПСМА (или CD3) способна только первая антигенсвязывающая молекула (насыщающая), то заключают, что исследуемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с ПСМА (или CD3). Среднему специалисту в данной области техники очевидно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания с перекрывающимся или с соседним эпитопом.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул

Антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении конкретных антигенов, можно получить с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два различных антигенсвязывающих домена, специфичных в отношении двух различных антигенов (например, CD3 и ПСМА), можно соответствующим образом разместить друг относительно друга с получением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению с применением общепринятых способов.

(Обсуждение форматов иллюстративных биспецифичных антител, которые можно использовать для конструирования биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, представлено в другом месте настоящего описания.) Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения один или более из отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению получают из химерных, гуманизированных антител или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более из тяжелой и/или легкой цепей биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению можно получить с применением технологии VELOCIMMUNE™. С применением технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения антитела человека) сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против конкретного антигена (например, CD3 или ПСМА), содержащие переменную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуют и проводят отбор в отношении желаемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека для получения полностью человеческих тяжелой и/или легкой цепей, которые можно встроить в биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул человека можно применять генно-инженерных животных. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна к реаранжировке и экспрессии эндогенной последовательности варибельной области легкой цепи иммуноглобулина мыши, причем мышь экспрессирует исключительно один или два варибельных домена легкой цепи человека, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном константной области каппа мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две различные тяжелые цепи, связанные с идентичной легкой цепью, которая содержит варибельный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена варибельной области легкой цепи человека. (См., например, подробное обсуждение таких генно-инженерных мышей и их применения для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул в патенте США 2011/0195454).

#### Биоэквиваленты

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются от иллюстративных молекул, раскрытых в настоящем описании, но которые сохраняют способность к связыванию с CD3 и/или ПСМА. Такие варианты молекул могут содержать одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, по существу эквивалентную таковой описанных биспецифичных антигенсвязывающих молекул.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые являются биоэквивалентными любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании. Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень всасывания которых не демонстрируют значительного различия при введении в одинаковых молярных дозах при одинаковых экспериментальных условиях, как при однократной дозе, так и при многократных дозах. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по своей степени всасывания, но не по скорости всасывания, и еще могут считаться биоэквивалентами, так как такие различия в скорости всасывания являются намеренными, отражаются в мечении и не являются существенными в достижении эффективных концентраций лекарственного препарата, например, при длительном применении, а также считаются незначимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если клинически значимые различия их безопасности, чистоты и эффективности отсутствуют.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между эталонным препаратом и биологическим препаратом без ожидаемого повышения риска побочных эффектов, включающих клинически значимые изменения иммуногенности или ослабление эффективности по сравнению с продолжающейся терапией без такого переключения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют с помощью общего механизма или механизмов действия для условия или условий применения в такой степени, в какой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью методов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, для которых измеряют концентрацию антитела или его метаболитов как функцию от времени в крови, плазме, сыворотке или в другой биологической жидкости; (b) тест *in vitro*, который коррелирует с обоснованно прогнозированными данными биодоступности *in vivo* для человека; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, у которых соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, в котором проверяют безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифичных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей либо путем делеции внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть делетированы или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В другом контексте биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифичных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, содержащие замены аминокислот, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекулы, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и видовая перекрестная реактивность Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека, но не с CD3 из других видов. Также предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ПСМА человека, но не с ПСМА из других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и с CD3 из одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ПСМА человека и с ПСМА из одного или более видов, отличных от человека.

Согласно определенным иллюстративным вариантам реализации настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и/или ПСМА человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более CD3 и/или ПСМА мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, игрунки, макаки-резус или шимпанзе. Например, конкретный иллюстративный вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает ПСМА человека.

#### Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммуноподавляющее средство или радиоизотоп. Цитотоксические средства включают любое средство, которое отрицательно сказывается на клетках. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, публикацию WO 05/103081).

#### Терапевтический состав и введение

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению объединяют в процессе получения лекарственной формы с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Совокупность соответствующих лекарственных форм можно обнаружить в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Данные лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, липиды, липидосодержащие (катионные или анионные) носители (такие как LIPOFECTIN™ Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), ДНК-конъюгаты, пасты безводного всасывания, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояния, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или областью поверхности тела. Когда биспецифичную антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению используют для терапевтических целей у взрослого пациента, может быть преимущественным внутривенное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению, обычно в однократной дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно от 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозы и графики введения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы можно определить эмпирическим способом; например, прогресс у пациента можно отслеживать с помощью периодической оценки и соответственно корректировать дозу. Более того, можно осуществлять межвидовое масштабирование доз с применением способов, хорошо известных в данной области техники (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, использование рекомбинантных клеток, способных экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, публикацию Wu et al. 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный или пероральный пути введения. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, пероральную слизистую, ректальную и кишечную слизистую и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с применением стандартной иглы и шприца. Кроме того, по отношению к подкожной

доставке, при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению легко находит применение шприц-ручка для доставки. Такая шприц-ручка для доставки может быть использована повторно или может быть устройством однократного использования. В повторно используемой шприц-ручке для доставки, как правило, применяют заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как введена вся фармацевтическая композиция внутри картриджа, и картридж становится пустым, пустой картридж можно легко удалить или заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку для доставки можно использовать повторно. В одноразовой шприц-ручке для доставки нет заменяемого картриджа. Напротив, одноразовая шприц-ручка для доставки уже предварительно наполнена фармацевтической композицией, которая находится внутри емкости внутри устройства. После того как из емкости удаляется фармацевтическая композиция все устройство выбрасывается.

Многочисленные повторно используемые шприц-ручки и устройства с автоинжектором для доставки находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают, без ограничения, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), среди прочих. Примеры одноразовых шприц-ручек для доставки, имеющих применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLETT™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park IL) среди прочих.

В некоторых случаях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения можно применять насос (см. Langer, ссылка выше; Sefton 1987 CRC Crit. Ref. Biomed. Eng, 14:201). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения можно использовать полимерные материалы, см. руководство Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения система с контролируемым высвобождением может помещаться поблизости от мишени композиции, таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, ссылка выше, vol. 2, pp. 115-138). Обзор и обсуждение других систем с контролируемым высвобождением приведены в Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъецируемые препараты могут включать дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Данные инъецируемые препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъецируемые препараты можно получить, например, с помощью растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанного выше, в стерильной водной среде или в масляной среде, общепринято используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций применяют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие дополнительные средства и т.д., которые можно применять в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый аддукт (50 моль) гидрогенизированного касторового масла)) и т.д. В качестве масляной среды применяют, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Раствор для инъекции, полученный таким образом, предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в дозированных формах в единице дозы, подходящей для добавления дозы активных компонентов. Такие дозированные формы в единице дозы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Содержащееся количество вышеуказанного антигена, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на дозированную форму в единице дозы; в особенности, в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеуказанное антигеном содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и в количестве от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Варианты терапевтического применения антигенсвязывающих молекул

Настоящее изобретение включает способы, включающие введение субъекту, который нуждается в таком введении, терапевтической композиции, содержащей антигеном против ПСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CD3 и ПСМА. Терапевтическая композиция может содержать любое из антигеном или биспеци-

фичных антигенсвязывающих молекул, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В настоящем документе выражение "субъект, который нуждается в таком введении" означает человека или животного, отличного от человека, у которого наблюдаются один или более симптомов или признаков рака (например, субъект, экспрессирующий опухоль или страдающий от любого из типов рака, упомянутых в настоящем документе ниже), или который иным способом получит пользу от ингибирования или снижения активности ПСМА или истощения ПСМА+клеток (например, клеток рака предстательной железы).

Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению (и терапевтические композиции, содержащие указанные антитела и молекулы) являются подходящими, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при которых будут благоприятными стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа. В частности, антитела против ПСМА или биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD3/против ПСМА согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, предотвращения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанных с или опосредованных экспрессией или активностью ПСМА или пролиферацией ПСМА+клеток. Механизм действия, посредством которого обеспечивают терапевтические способы согласно настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих ПСМА, в присутствии эффекторных клеток, например посредством КЗЦ, апоптоза, АЗКЦ, фагоцитоза или посредством комбинации двух или более из данных механизмов. Клетки, экспрессирующие ПСМА, которые можно ингибировать или уничтожить с применением биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, включают, например, клетки опухоли предстательной железы.

Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в желудочно-кишечном тракте, предстательной железе, почках и/или мочевом пузыре. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению используют для лечения одного или более из следующих типов рака: прозрачноклеточной почечно-клеточной карциномы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, онкоцитомы (почек), переходно-клеточной карциномы (почек), рака предстательной железы, колоректального рака, рака желудка, уротелиальной карциномы, аденокарциномы (мочевика) или мелкоклеточной карциномы (мочевика). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела против ПСМА или биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 являются подходящими для лечения пациента, страдающего от кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Согласно другим близким вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы, включающие введение антитела против ПСМА или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА, раскрытых в настоящем описании, пациенту, страдающему от кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Для определения того, несет ли пациент кастрационно-резистентную опухоль, можно применять аналитические/диагностические способы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухоли и т.д.

Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. В настоящем документе термин "остаточный рак" означает существование или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией.

Согласно определенным аспектам в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ПСМА (например, рака предстательной железы), включающие введение одного или более антител против ПСМА или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте настоящего документа, субъекту после того, как было определено, что субъект страдает от рака предстательной железы (например, кастрационно-резистентного рака предстательной железы). Например, настоящее изобретение включает способы лечения рака предстательной железы, включающие введение антитела против ПСМА или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD3/против ПСМА пациенту 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 того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

#### Комбинированные терапии и составы

В настоящем изобретении предложены способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любые из иллюстративных антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно объединить с антигенсвязывающей молекулой или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, включают, например, антагонист EGFR (например, антитело против EGFR (например, цетуксимаб или панитумумаб) или низкомолекулярный ингибитор EGFR (например, гефитиниб или эрлотиниб)), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитело против ErbB2, против ErbB3 или против ErbB4 или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфично связывается с EGFRvIII), антагонист cMET (например, антитело против cMET), антагонист IGF1R (например, антитело против IGF1R), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-

0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- $\alpha$  (например, антитело против PDGFR- $\alpha$ ), ингибитор PDGFR- $\beta$  (например, антитело против PDGFR- $\beta$ ), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, см., например, патент США 7087411 (также называется в настоящем документе "VEGF-ингибирующий слитый белок"), антитело против VEGF (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, антитело против DLL4, раскрытое в патенте США 2009/0142354, такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, антитело против Ang2, раскрытое в патенте США 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (ПСМА), антагонист PRLR (например, антитело против PRLR), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, антитело против STEAP1 или антитело против STEAP2), антагонист TMRSS2 (например, антитело против TMRSS2), антагонист MSLN (например, антитело против MSLN), антагонист CA9 (например, антитело против CA9), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина) и т.д. Другие средства, которые можно с пользой вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включающие низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18, или с соответствующими рецепторами цитокинов. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD3/против ПСМА, раскрытую в настоящем документе) можно также вводить в виде части терапевтического режима, включающего одну или более терапевтических комбинаций, которые выбраны из "ICE": ифосфамид (например, Ифекс®), карбоплатин (например, Параплатин®), этопозид (например, Этопозифос®, Топосар®, Вепесид®, VP-16); "DHAP": дексаметазон (например, Декадрон®), цитарабин (например, Цитозар-U®, цитозина арабинозид, ага-С), цисплатин (например, Платинол®-AQ); и "ESHAP": этопозид (например, Этопозифос®, Топосар®, Вепесид®, VP-16), метилпреднизолон (например, Медрол®), высокие дозы цитарабина, цисплатин (например, Платинол®-AQ).

Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в настоящем документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1 (ПСМА), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептид-ассоциированное антитело, нанотело или фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент; F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; dAb-фрагмент; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, миниантитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению также можно вводить и/или совместно приготовить в состав в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анелгизирующими средствами, кортикостероидами и/или НПВС (нестероидными противовоспалительными препаратами). Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению также можно вводить в виде части режима лечения, который также включает лучевую терапию и/или общепринятую химиотерапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент или компоненты можно вводить непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению (для целей настоящего изобретения такие режимы введения считают введением антигенсвязывающей молекулы "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению комбинируется с одним или более дополнительным терапевтически активным компонентом(ми), как описано в другом месте настоящего документа.

#### Режимы введения

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против ПСМА или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывается с ПСМА и CD3) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В настоящем документе "последовательное введение" означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в различные моменты времени, например, в различные дни, разделенные предопределенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, после которой следует одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и после которых необязательно следует одна или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" означают временную последовательность введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (также называют

"исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга в отношении частоты введения. Однако согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, которое содержится в начальной, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, откорректировано с повышением или понижением при необходимости) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в виде "нагрузочных доз", после которых следуют последующие дозы, которые вводят менее часто (например, "поддерживающие дозы").

Согласно одному иллюстративному варианту реализации настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через от 1 до 26 (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза" в настоящем документе означает в последовательности нескольких введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности при отсутствии промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против ПСМА или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывается с ПСМА и CD3). Например, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах реализации, включающих несколько 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, включающих несколько 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 качестве альтернативы частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать в течение курса режима лечения. Частоту введения также может корректировать лечащий врач в течение курса лечения в зависимости от потребностей индивидуального пациента после клинического обследования.

#### Варианты диагностического применения антител

Антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению также можно применять для обнаружения и/или измерения ПСМА или клеток, экспрессирующих ПСМА, в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против ПСМА или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, которое характеризуется нарушением экспрессии (например, сверхэкспрессией, низкой экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) ПСМА. Иллюстративные диагностические анализы ПСМА могут включать, например, осуществление контакта образца, полученного от пациента, с антителом против ПСМА согласно настоящему изобретению, причем антитело против ПСМА помечено с помощью обнаруживаемой метки или репортерной молекулы. В качестве альтернативы немеченное антитело против ПСМА можно использовать в диагностических применениях в комбинации с вторичным антителом, которое само помечено с помощью обнаруживаемой метки. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S или <sup>125</sup>I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другие иллюстративные диагностические варианты применения антител против ПСМА согласно настоящему изобретению включают <sup>89</sup>Zr-меченное, такое как <sup>89</sup>Zr-дезферриоксамин-меченное, антитело для целей неинвазивной идентификации и отслеживания опухолевых клеток у субъекта (например, визуализации методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ)). (См., например, Tavaré, R. et al. Cancer Res. 2016 Jan 1;76 (1): 73-82; и Azad, BB. et al. Oncotarget. 2016 Mar 15; 7(11): 12344-58.) Специфичные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения ПСМА в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (fluorescent-activated cell sorting, FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах ПСМА согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит обнаруживаемые количества белка ПСМА или фрагменты указанного белка, в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни ПСМА в конкретном образце, полученном от здорового

пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания или состояния, связанного с аномальными уровнями или активностью ПСМА), будут измерены для первоначального установления исходного или стандартного уровня ПСМА. Затем данный исходный уровень ПСМА можно сравнить с уровнями ПСМА, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, которые, согласно прогнозу, страдают от заболевания или состояния, связанного с ПСМА (например, от опухоли, содержащей экспрессирующие ПСМА клетки).

### Примеры

Следующие примеры использованы с тем, чтобы обеспечить среднего специалиста в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как получить или применить способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), однако должны быть приняты во внимание некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано обратное, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к нему.

#### Пример 1. Нарботка антител против ПСМА.

Антитела против ПСМА получали иммунизацией генетически модифицированной мыши антигеном ПСМА человека или иммунизацией генно-инженерной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека, антигеном ПСМА человека.

Мышей иммунизировали клетками рака предстательной железы человека (LNCaP, ATTC®, Manassas, Вирджиния, США), экспрессирующими ПСМА человека (SEQ ID NO:1651; UniProtKB/Swiss-Prot. № Q04609). После иммунизации от каждой мыши отбирали спленоциты и (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования клеток гибридомы и проводили скрининг в отношении специфичности к ПСМА, или (2) проводили сортировку В-клеток (как описано в публикации US 2007/0280945A1) с применением ПСМА человека с N-концевой меткой 6-His (R&D, кат. № 4234-ZN) в качестве реактива для сортировки, который связывается с реактивными антителами и идентифицирует их (антиген-положительные В-клетки).

Сначала выделяли химерные антитела против ПСМА, содержащие вариабельную область человека и константную область мыши. Антитела характеризовали и проводили скрининг в отношении желаемых характеристик, включая аффинность, селективность и т.д. При необходимости константные области мыши заменяли желаемой константной областью человека, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, с получением полностью человеческого антитела против ПСМА. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени локализуются в вариабельной области. Обозначения названия антитела, такие как H1H11453N2 и H1M11900N, означают полностью человеческие антитела "H1H" или химерные антитела с вариабельной областью человека/константной областью мыши "H1M". Антитела, идентифицированные с помощью способа гибридомы, обозначены идентификационными номерами антитела, которые оканчиваются на "N" или "N2"; антитела, идентифицированные с помощью способа сортировки В-клеток, обозначены идентификационными номерами антитела, которые оканчиваются на "P" или "P2".

Некоторые биологические свойства иллюстративных антител против ПСМА, наработанных согласно способам данного примера, подробно описаны в примерах, представленных ниже.

#### Пример 2. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельной области тяжелой и легкой цепей антител против ПСМА.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител против ПСМА согласно настоящему изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

| Обозначение антитела | SEQ ID NO: |       |       |       |      |       |       |       |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
|                      | HCVR       | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| H1N11453N2           | 2          | 4     | 6     | 8     | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11792P2           | 10         | 12    | 14    | 16    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11797P2           | 18         | 20    | 22    | 24    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11800P2           | 26         | 28    | 30    | 32    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11803P2           | 34         | 36    | 38    | 40    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11804P2           | 42         | 44    | 46    | 48    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11805P2           | 50         | 52    | 54    | 56    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11808P2           | 58         | 60    | 62    | 64    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11810P2           | 66         | 68    | 70    | 72    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11835P2           | 74         | 76    | 78    | 80    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11836P2           | 82         | 84    | 86    | 88    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11837P2           | 90         | 92    | 94    | 96    | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11838P2           | 98         | 100   | 102   | 104   | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11841P2           | 106        | 108   | 110   | 112   | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N11899N2           | 114        | 116   | 118   | 120   | 1642 | 1644  | 1646  | 1648  |
| H1N3465P             | 122        | 124   | 126   | 128   | 130  | 132   | 134   | 136   |
| H1M11900N            | 138        | 140   | 142   | 144   | 146  | 148   | 150   | 152   |

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

| Обозначение антитела | SEQ ID NO: |       |       |       |      |       |       |       |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
|                      | HCVR       | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| H1N11453N2           | 1          | 3     | 5     | 7     | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11792P2           | 9          | 11    | 13    | 15    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11797P2           | 17         | 19    | 21    | 23    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11800P2           | 25         | 27    | 29    | 31    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11803P2           | 33         | 35    | 37    | 39    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11804P2           | 41         | 43    | 45    | 47    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11805P2           | 49         | 51    | 53    | 55    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11808P2           | 57         | 59    | 61    | 63    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11810P2           | 65         | 67    | 69    | 71    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11835P2           | 73         | 75    | 77    | 79    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11836P2           | 81         | 83    | 85    | 87    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11837P2           | 89         | 91    | 93    | 95    | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11838P2           | 97         | 99    | 101   | 103   | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11841P2           | 105        | 107   | 109   | 111   | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N11899N2           | 113        | 115   | 117   | 119   | 1641 | 1643  | 1645  | 1647  |
| H1N3465P             | 121        | 123   | 125   | 127   | 129  | 131   | 133   | 135   |
| H1M11900N            | 137        | 139   | 141   | 143   | 145  | 147   | 149   | 151   |

Пример 3. Полученные методом поверхностного плазмонного резонанса аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека против ПСМА.

В данном примере оценивали способность антител против ПСМА связываться с ПСМА человека. Аффинности связывания и кинетические константы антител против ПСМА с растворимым белком ПСМА человека определяли методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C с применением формата захвата антитела. Результаты представлены в табл. 3 и 4. Измерения проводили на приборе Biacore T-200 (GE Healthcare).

Вкратце, поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали посредством аминного сочетания моноклональным антителом мыши против Fc человека (GE, №BR-1008-39) или моноклональным антителом козы против Fc мыши (GE, №BR-1008-38) для захвата очищенных антител против ПСМА. Исследования связывания проводили в буфере HBSP++, содержащем 0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 2 мМ Ca<sup>2+</sup>, 2 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,05% об./об. сурфактанта P20, pH 7,4. Варьирующие концентрации ПСМА человека, экспрессированного с N-концевой гексагистиридиновой меткой (6h.hPSMA, R&D), приготовленного в буфере для анализа HBSP++ (в диапазоне от 50 до 0,78 нМ, 4-кратные разведения), инжестировали на поверхность с захваченным антителом против ПСМА при скорости потока 30 мкл/мин. Ассоциацию антитело-реактив контролировали в течение 2 мин, в то время как диссоциацию в буфере для анализа HBSP++ контролировали в течение 8 мин.

Кинетические константы скорости ассоциации (k<sub>a</sub>) и диссоциации (k<sub>d</sub>) определяли посредством аппроксимации сенсограмм в режиме реального времени к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации

связывания ( $K_D$ ) и диссоциационные периоды полувыведения ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости в виде:  $K_D(M) = k_d/k_a$ ; и  $t_{1/2}(\text{мин}) = (\ln 2)/(60 \cdot k_d)$ .

Как показано в табл. 3 и 4, антитела против ПСМА согласно настоящему изобретению связывались с ПСМА человека в формате захвата антитела с различными аффинностями и значениями  $K_D$  в диапазоне от 19,9 пМ до 75,6 нМ. Некоторые иллюстративные антитела против ПСМА, такие как H1N3465P и H1N1810P2, продемонстрировали высокую аффинность в отношении белка ПСМА человека с субнано-молярными значениями  $K_D$ .

Таблица 3. Аффинности антител IgG1 человека против ПСМА в отношении растворимого ПСМА человека при температуре 37°C

| Идентиф. номер антитела | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с)  | $K_D$ (М)       | $t_{1/2}$ (мин.) |
|-------------------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|
| H1N3465P                | 2,67E+05     | 6,06E-05     | 2,27E-10        | 190,6            |
| H1N11792P2              | 4,73E+05     | 9,70E-05     | 2,05E-10        | 119,1            |
| H1N11797P2              | 1,68E+05     | 6,30E-04     | 3,74E-09        | 18,3             |
| H1N11800P2              | 2,51E+05     | 4,10E-05     | 1,63E-10        | 281,8            |
| H1N11803P2              | 4,57E+05     | 6,08E-04     | 1,33E-09        | 19               |
| H1N11804P2              | 2,03E+04     | 8,01E-04     | 3,94E-08        | 14,4             |
| H1N11805P2              | 1,29E+05     | 9,74E-03     | 7,56E-08        | 1,2              |
| H1N11808P2              | 1,78E+05     | $\leq 1E-05$ | $\leq 5,63E-11$ | $\geq 1155$      |
| H1N11810P2              | 5,03E+05     | $\leq 1E-05$ | $\leq 1,99E-11$ | $\geq 1155$      |
| H1N11835P2              | 1,75E+05     | 2,46E-03     | 1,40E-08        | 4,7              |
| H1N11836P2              | 3,27E+05     | 2,80E-04     | 8,55E-10        | 41,3             |
| H1N11837P2              | 4,41E+05     | 7,34E-04     | 1,66E-09        | 15,7             |
| H1N11838P2              | 2,37E+05     | 4,71E-04     | 1,99E-09        | 24,5             |
| H1N11841P2              | НУ           | НУ           | НУ              | НУ               |

НУ: неубедительный результат

Таблица 4. Аффинности антител на основе константной области мыши против ПСМА в отношении растворимого ПСМА человека при температуре 37°C

| Идентиф. номер антитела | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин.) |
|-------------------------|--------------|-------------|-----------|------------------|
| H2M11899N               | 1,51E+05     | 2,65E-04    | 1,76E-09  | 43,6             |
| H1M11453N               | 1,85E+05     | 3,56E-04    | 1,93E-09  | 32,4             |
| H1M11900N               | 1,57E+05     | 4,06E-03    | 2,58E-08  | 2,8              |

Пример 4. Нарботка биспецифичных антител, которые связываются с простатспецифическим мембранным антигеном (ПСМА) и CD3.

В настоящем изобретении предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 и простатспецифический мембранный антиген (ПСМА); такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также называют в настоящем документе "биспецифичными молекулами против ПСМА/против CD3". Часть биспецифичной молекулы против ПСМА/против CD3, направленная против ПСМА, является подходящей для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют ПСМА, и часть биспецифичной молекулы, направленная против CD3, является подходящей для активации Т-клеток. Одновременное связывание с ПСМА на опухолевой клетке и с CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (клеточный лизис) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой.

Биспецифичные антитела, содержащие домен связывания, специфичный к ПСМА, и домен связывания, специфичный к CD3, были сконструированы с применением стандартных методик, причем каждый из антигенсвязывающего домена против ПСМА и антигенсвязывающего домена против CD3 содержал различные отдельные HCVR, спаренные с общей LCVR. В некоторых случаях биспецифичные антитела были сконструированы с применением тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против ПСМА и общей легкой цепи. В других случаях биспецифичные антитела были сконструированы с применением тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против ПСМА и легкой цепи из антитела против CD3.

Биспецифичные антитела, описанные в следующих примерах, состоят из связывающих плеч, которые, как известно, связываются с растворимым гетеродимерным белком hCD3ε/δ человека (как описано в примерах 9-13 в настоящем документе); и ПСМА человека (см. примеры 1-3 выше). Получали иллюстративные биспецифичные антитела, которые содержали модифицированный (химерный) Fc-домен IgG4, представленный в публикации заявки на патент США № US 20140243504 A1, опубликованной 28 августа 2014 года.

Краткая характеристика составных частей антигенсвязывающих доменов различных сконструированных биспецифичных антител против ПСМАх CD3 представлена в табл. 5.

Таблица 5. Краткая характеристика составных частей  
биспецифичных антител против ПСМАх CD3

| Идентификатор<br>биспецифичного<br>антитела | Против ПСМА                                                                       | Против CD3                                                                        | Общая<br>вариабельная<br>область легкой<br>цепи |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                             | Антигенсвязываю-<br>щий домен<br><i>Вариабельная<br/>область тяжелой<br/>цепи</i> | Антигенсвязываю-<br>щий домен<br><i>Вариабельная<br/>область тяжелой<br/>цепи</i> |                                                 |
| BSPSMA/CD3-001                              | PSMA-VH-3465                                                                      | CD3-VH-A                                                                          | CD3-VL-A                                        |
| BSPSMA/CD3-002                              | PSMA-VH-3465                                                                      | CD3-VH-B                                                                          | CD3-VL-B                                        |
| BSPSMA/CD3-003                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G                                                                          | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-200                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G2                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-300                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G3                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-400                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G4                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-004                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G5                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-800                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G8                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-900                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G9                                                                         | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1000                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G10                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1100                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G11                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1200                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G12                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1300                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G13                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1400                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G14                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1500                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G15                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1600                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G16                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1700                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G17                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1800                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G18                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-1900                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G19                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-005                              | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G20                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |
| BSPSMA/CD3-2100                             | PSMA-VH-11810                                                                     | CD3-VH-G21                                                                        | VK 1-39 JK 5<br>(SEQ ID<br>NO:1386)             |

Вариабельная область тяжелой цепи против ПСМА PSMA-VH-3465 представляет собой HCVR H1H3465P (SEQ ID NO:122) из табл. 1. Вариабельная область тяжелой цепи против ПСМА PSMA-VH-11810 представляет собой HCVR H1H11810P2 (SEQ ID NO:66) из табл. 1.

Вариабельная область тяжелой цепи против CD3 CD3-VH-A представляет собой HCVR H1H5778P (SEQ ID NO:922) из табл. 12. Вариабельная область тяжелой цепи против CD3 CD3-VH-B представляет собой HCVR H1H2712N (SEQ ID NO:154) из табл. 12. Вариабельные области тяжелой цепи против CD3 CD3-VH-G, CD3-VH-G2, CD3-VH-G3, CD3-VH-G4, CD3-VH-G5, CD3-VH-G8, CD3-VH-G9, CD3-VH-G10, CD3-VH-G11, CD3-VH-G12, CD3-VH-G13, CD3-VH-G14, CD3-VH-G15, CD3-VH-G16, CD3-VH-G17, CD3-VH-G18, CD3-VH-G19, CD3-VH-G20 и CD3-VH-G21 описаны в табл. 18.

Легкие цепи в табл. 5 являлись общими для плеч биспецифичных антител, нацеленных на CD3 и на ПСМА. Вариабельная область легкой цепи против CD3 CD3-VL-A представляет собой LCVR H1H5778P (SEQ ID NO: 930) из табл. 12. Вариабельная область легкой цепи против CD3 CD3-VL-B представляет собой LCVR H1H2712N (SEQ ID NO: 162) из табл. 12. Вариабельная область легкой цепи VK 1-39 JK 5 представляет собой SEQ ID NO: 1386 из табл. 20. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей различных вариабельных областей тяжелой цепи и их соответствующих CDR плеч биспецифичных антител, направленных против ПСМА, данного примера. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеотидов, кодирующих вариабельные области тяжелой цепи, и их соответствующих CDR антигенсвязывающих доменов против ПСМА биспецифичных антител данного примера.

В табл. 12, 14, 15, 18 и 20 представлены аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и их соответствующих CDR для плеч биспецифичных антител, направленных против CD3, а также аминокислотные последовательности вариабельных областей легкой цепи и их соответствующих CDR, общие для обоих плеч биспецифичных антител данного примера. В табл. 13, 16, 17, 19 и 21 представлены соответствующие последовательности нуклеотидов для данных свойств биспецифичных антител данного примера.

Пример 5. Аффинности связывания иллюстративных биспецифичных антител, измеренные в анализе FACS.

В данном примере определяли способность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3, описанных в примере 4, связываться с линиями клеток, экспрессирующими ПСМА человека, и с линиями клеток, экспрессирующими CD3 человека и яванского макака, методом FACS. Как описано выше, в биспецифичных антителах согласно настоящему изобретению используется связывающее плечо ПСМА-специфичной тяжелой цепи (НС), спаренное с набором связывающих плеч НС против CD3 и общей легкой цепью. Связывающие плечи ПСМА-НС в биспецифичных антителах, ниже, продемонстрировали сильное связывание с белком ПСМА человека, определенное методом поверхностного плазмонного резонанса (пример 3). Как описано в примерах 6 и 13 настоящего документа, CD3-связывающие плечи НС также продемонстрировали диапазон аффинностей в отношении растворимого гетеродимерного белка hCD3ε/δ.mFc человека, определенный методом поверхностного плазмонного резонанса.

Вкратце,  $2 \times 10^5$  клеток/лунку Юркат, экспрессирующих CD3 человека, Т-клеток яванского макака или ПСМА человека-специфичных экспрессирующих клеток инкубировали с серийными разведениями биспецифичных антител в течение 30 мин при температуре 4°C. После инкубации клетки промывали и к клеткам добавляли меченные ФЭ (фикоэритрином) вторичные антитела козы F(ab')<sub>2</sub> против Fcγ человека (Jackson Immunolabs) еще на 30 мин. Затем клетки промывали, ресуспендировали в холодном ФБР (фосфатном буферном растворе)+1% БСА и анализировали методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Canto II.

Для анализов методом FACS клетки отбирали на основе высоты прямого светорассеяния по сравнению с площадью прямого светорассеяния для выбора единичных событий, после чего проводили боковое и прямое светорассеяние. EC<sub>50</sub> для титрования связывания клеток определяли с применением программного обеспечения Prism. Значения рассчитывали с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели.

Таблица 6. Связывание методом FACS на CD3- и ПСМА-специфичных линиях клеток

| Идентификатор биспецифичного антитела | Связывающее плечо против CD3 | Юркат                | Т-клетки яванского макака | B16F10.9/PSMA        | 22RV1                |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
|                                       |                              | EC <sub>50</sub> [М] | EC <sub>50</sub> [М]      | EC <sub>50</sub> [М] | EC <sub>50</sub> [М] |
| BSPSMA/CD3-001                        | CD3-VH-A                     | 3,91E-08             | НИ                        | НИ                   | 7,85E-08             |
| BSPSMA/CD3-002                        | CD3-VH-B                     | НИ                   | НИ                        | НИ                   | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-003                        | CD3-VH-G                     | 1,65E-08             | 1,42E-08                  | 2,26E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-200                        | CD3-VH-G2                    | ОС                   | ОС                        | 1,88E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-300                        | CD3-VH-G3                    | ОС                   | ОС                        | 1,90E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-400                        | CD3-VH-G4                    | ОС                   | ОС                        | 1,72E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-004                        | CD3-VH-G5                    | ~1,0E-06             | ОС                        | 1,31E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-800                        | CD3-VH-G8                    | 1,93E-08             | 1,96E-08                  | 1,31E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-900                        | CD3-VH-G9                    | 2,74E-07             | ОС                        | 1,43E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1000                       | CD3-VH-G10                   | 2,77E-07             | ОС                        | 1,19E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1100                       | CD3-VH-G11                   | 1,83E-08             | 8,90E-07                  | 1,03E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1200                       | CD3-VH-G12                   | 4,72E-08             | ОС                        | 1,16E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1300                       | CD3-VH-G13                   | 1,02E-07             | 2,17E-06                  | 1,25E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1400                       | CD3-VH-G14                   | 3,19E-08             | 1,70E-07                  | 1,30E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1500                       | CD3-VH-G15                   | 9,30E-08             | ОС                        | 1,21E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1600                       | CD3-VH-G16                   | 5,68E-08             | ОС                        | 1,03E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1700                       | CD3-VH-G17                   | 2,00E-07             | 3,35E-06                  | 1,34E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1800                       | CD3-VH-G18                   | 1,26E-07             | ОС                        | 2,16E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-1900                       | CD3-VH-G19                   | 6,07E-08             | ОС                        | 1,35E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-005                        | CD3-VH-G20                   | 2,10E-07             | 6,14E-06                  | 2,09E-09             | НИ                   |
| BSPSMA/CD3-2100                       | CD3-VH-G21                   | 1,06E-07             | ОС                        | 1,14E-09             | НИ                   |

ОС=отсутствие связывания; НИ=не исследовали

Как показано в табл. 6, исследованные биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 продемонстрировали специфичность связывания с линиями клеток B16F10.9/hPSMA и 22RV1, экспрессирующими ПСМА человека, методом FACS. Предел обнаружения связывания методом FACS составляет EC<sub>50</sub> 1 мкМ.

Как показано в табл. 6, CD3-связывающие плечи каждого биспецифичного антитела против CD3хПСМА продемонстрировали диапазон аффинности связывания с клетками на клетках Юркат, экспрессирующих CD3 человека (диапазон EC<sub>50</sub> от 15 до 300 нМ). Важно отметить, что плечи CD3, которые продемонстрировали от слабого связывания до отсутствия связывания с гетеродимерным белком CD3 человека методом поверхностного плазмонного резонанса (см. табл. 7 в настоящем документе ниже), также коррелировали с от слабого связывания до отсутствия обнаруживаемого связывания на клетках Юркат (т.е. CD3-VH-G2, CD3-VH-G3, CD3-VH-G5). Некоторые CD3-связывающие плечи также продемонстрировали перекрестную реактивность в отношении Т-клеток яванского макака. Все исследованные биспецифичные антитела продемонстрировали подобное связывание с клетками на соответствующих линиях клеток, экспрессирующих ПСМА; это подтверждает, что биспецифичное спаривание с отдельными плечами CD3 не оказывает влияния или снижает ПСМА-специфичное связывание (ПСМА-специфичное связывание являлось меньшим или равным 5,6 нМ (высокая аффинность) во всех исследованных примерах).

Антитела, демонстрирующие от слабого связывания до отсутствия обнаруживаемого связывания с CD3 человека, а также демонстрирующие от слабого связывания до отсутствия связывания с CD3 яванского макака, считали преимущественными для запускаемого авидностью биспецифичного спаривания согласно настоящему изобретению, и дополнительно исследовали в отношении цитотоксичности в анализах *in vitro* и *in vivo*.

Пример 6. Аффинности связывания иллюстративных антител, измеренные в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса.

Аффинности связывания и кинетические константы биспецифичных антител против ПСМАх против CD3 в отношении растворимого гетеродимерного белка hCD3ε/δ.mFc (hCD3ε=UniProtKB/Swiss-Prot: P07766.2; SEQ ID NO: 1652; hCD3δ=UniProtKB/Swiss-Prot: P04234.1, SEQ ID NO: 1653) определяли методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C с применением формата захвата антигена (табл. 7). Измерения проводили на приборе Sierra Sensors MASS-1.

В формате захвата антигена поверхность аминного сенсора с высокой плотностью MASS-1 деривати-

зировали поликлональным антителом козы против IgG2a мыши (Southern Biotech). Захватывали растворимый гетеродимерный белок CD3, и соответствующие антитела инжестировали на захваченный антиген.

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством обработки и аппроксимации данных к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривых MASS-1 AnalyserR2. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и диссоциационные периоды полувыведения ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости в виде:  $K_D(M)=k_d/k_a$ ; и  $t_{1/2}(\text{мин})=(\ln 2)/(60*k_d)$ .

Таблица 7. Аффинности биспецифичных антител против CD3 в отношении растворимого CD3 человека

| Связывание при температуре 37°C /формат захвата антигена |                                                                  |                                          |                          |           |                  |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|-----------|------------------|
| Идентификатор биспецифичного антитела                    | Идентификатор соответствующей антигенсвязывающей HCVR против CD3 | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (M) | $T_{1/2}$ (мин.) |
| BSPSMA/CD3-003                                           | CD3-VH-G                                                         | 1,32E+05                                 | 7,62E-04                 | 5,78E-09  | 15,2             |
| BSPSMA/CD3-200                                           | CD3-VH-G2                                                        | OC                                       | OC                       | OC        | OC               |
| BSPSMA/CD3-300                                           | CD3-VH-G3                                                        | OC                                       | OC                       | OC        | OC               |
| BSPSMA/CD3-400                                           | CD3-VH-G4                                                        | OC                                       | OC                       | OC        | OC               |
| BSPSMA/CD3-004                                           | CD3-VH-G5                                                        | OC                                       | OC                       | OC        | OC               |
| BSPSMA/CD3-800                                           | CD3-VH-G8                                                        | 5,95E+04                                 | 1,15E-03                 | 1,94E-08  | 10,0             |
| BSPSMA/CD3-900                                           | CD3-VH-G9                                                        | 4,38E+04                                 | 4,95E-03                 | 1,13E-07  | 2,3              |
| BSPSMA/CD3-1000                                          | CD3-VH-G10                                                       | 3,44E+04                                 | 6,37E-03                 | 1,85E-07  | 1,8              |
| BSPSMA/CD3-1100                                          | CD3-VH-G11                                                       | 9,21E+04                                 | 1,02E-03                 | 1,11E-08  | 11,3             |
| BSPSMA/CD3-1200                                          | CD3-VH-G12                                                       | 3,85E+04                                 | 2,47E-03                 | 6,42E-08  | 4,7              |
| BSPSMA/CD3-1300                                          | CD3-VH-G13                                                       | 2,03E+04                                 | 2,48E-03                 | 1,22E-07  | 4,7              |
| BSPSMA/CD3-1400                                          | CD3-VH-G14                                                       | 6,21E+04                                 | 3,31E-03                 | 5,33E-08  | 3,5              |
| BSPSMA/CD3-1500                                          | CD3-VH-G15                                                       | 7,36E+04                                 | 6,11E-03                 | 8,29E-08  | 1,9              |
| BSPSMA/CD3-1600                                          | CD3-VH-G16                                                       | 6,43E+04                                 | 2,43E-03                 | 3,78E-08  | 4,7              |
| BSPSMA/CD3-1700                                          | CD3-VH-G17                                                       | 4,70E+04                                 | 3,07E-03                 | 6,52E-08  | 3,8              |
| BSPSMA/CD3-1800                                          | CD3-VH-G18                                                       | OC                                       | OC                       | OC        | OC               |
| BSPSMA/CD3-1900                                          | CD3-VH-G19                                                       | 4,43E+04                                 | 5,09E-03                 | 1,15E-07  | 2,3              |
| BSPSMA/CD3-005                                           | CD3-VH-G20                                                       | 1,73E+04                                 | 5,77E-03                 | 3,34E-07  | 2,0              |
| BSPSMA/CD3-2100                                          | CD3-VH-G21                                                       | 3,02E+04                                 | 2,34E-03                 | 7,75E-08  | 4,9              |
| Контроль 1                                               | CD3-L2K                                                          | 3,68E+05                                 | 2,66E-03                 | 7,22E-09  | 4,3              |

Как показано в табл. 7, биспецифичные антитела против CD3 x против ПСМА сохраняли очень слабое связывание с растворимым CD3 в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса, например, со значением  $K_D$  более 11 нМ вплоть до 334 нМ, что является более слабым, чем такое биспецифичного плеча против CD3, полученного из каркасных участков зародышевой линии, CD3-VH-G, или не демонстрировали какого-либо обнаруживаемого связывания.

В силу этого некоторые биспецифичные антитела продемонстрировали значения  $K_D$  более 50 нМ, а некоторые более 100 нМ (т.е. BSPSMA/CD3-900, BSPSMA/CD3-1000, BSPSMA/CD3-1900, BSPSMA/CD3-005) и даже вне предела обнаружения анализа, т.е. продемонстрировали отсутствие обнаруживаемого связывания с растворимым CD3 человека (т.е. BSPSMA/CD3-200, BSPSMA/CD3-300, BSPSMA/CD3-400, BSPSMA/CD3-004 и BSPSMA/CD3-1800).

Пример 7. Активация Т-клеток и опухоль-специфичная цитотоксичность, продемонстрированные биспецифичными антителами согласно настоящему изобретению, измеряемые in vitro.

В данном примере специфичное уничтожение клеток-мишеней, экспрессирующих ПСМА, в присутствии биспецифичных антител против ПСМА x против CD3 контролировали методом проточной цитометрии. Как сообщалось ранее, биспецифичные антитела продемонстрировали диапазон аффинности в отношении белка CD3 и линий клеток, экспрессирующих CD3 (т.е. слабое, умеренное и сильное связывание). Тот же набор биспецифичных антител исследовали в отношении способности к стимуляции наивных Т-клеток человека перенаправлять уничтожение на клетки, экспрессирующие мишень.

Вкратце линии клеток, экспрессирующие ПСМА (C4-2, 22Rv1 и TRAMPC2 PSMA), метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Violet Cell Tracker. После мечения клетки высевали в течение ночи при температуре 37°C. Отдельно МКПК человека высевали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среде RPMI с добавками и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C с целью обогатить лимфоцитами посредством истощения адгерентных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с адгерентными наивными МКПК после истощения клеток (соотношение эффекторной клетки/клетки-мишени 4:1) и серийным разведением соответствующих биспецифичных антител или изотипического контроля (диапазон концентрации: от 66,7 нМ до 0,25 пМ) в течение 48 ч при температуре 37°C. Клетки удаляли из планшетов для культивирования клеток с применением буфера для диссоциации клеток, не содержащего фермент, и анализируют.

вали методом FACS.

Для анализов FACS клетки окрашивали с целью обнаружения живых/мертвых клеток отслеживающим клетки красителем дальнего красного спектра (Invitrogen). Непосредственно перед анализом методом FACS в каждую лунку добавляли  $5 \times 10^5$  бусин для подсчета. Для каждого образца собирали  $1 \times 10^4$  бусин. Для оценки специфичности уничтожения клетки отбирали в популяциях живых клеток, меченных Violet. Процент живой популяции записывали и использовали для расчета нормированной выживаемости.

Активацию Т-клеток оценивали посредством инкубации клеток с напрямую конъюгированными антителами против CD2 и CD69 и посредством регистрации процента активированных (CD69+) Т-клеток от суммарного количества Т-клеток (CD2+).

Как показывают результаты в табл. 8, в случае биспецифичных антител против ПСМА х против CD3 наблюдалось истощение клеток, экспрессирующих ПСМА. Большинство исследованных биспецифичных антител активировали и направляли Т-клетки человека к истощению клеток-мишеней с  $EC_{50}$  в пиколярном диапазоне. Дополнительно наблюдаемый лизис клеток-мишеней был связан с повышающей регуляцией CD69 клеток на CD2+ Т-клетках с пиколярной  $EC_{50}$ .

Важно отметить, что результаты данного примера демонстрируют, что некоторые биспецифичные молекулы, в которых использовали CD3-связывающее плечо, продемонстрировавшее от слабого связывания до отсутствия обнаруживаемого связывания с белком CD3 или клетками, экспрессирующими CD3 (т.е. CD3-VH-G5), все равно сохраняли способность активировать Т-клетки и продемонстрировали мощную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих опухолевый антиген.

Таблица 8. Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток отобранных биспецифичных антител против ПСМАх CD3

| Идентификатор биспецифичного антитела | Связывающее плечо против CD3 | $EC_{50}$ истощения клеток C4-2 [M] | $EC_{50}$ истощения клеток 22RV1 [M] | $EC_{50}$ истощения клеток TrampC2.PSMA [M] | $EC_{50}$ активации Т-клеток [M] |
|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|
| BSPSMA/CD3-003                        | CD3-VH-G                     | $1,03E-11$                          | НИ                                   | $6,43E-12$                                  | $1,23E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-200                        | CD3-VH-G2                    | НИ                                  | Отсутствие активности                | НИ                                          | Отсутствие активности            |
| BSPSMA/CD3-300                        | CD3-VH-G3                    | НИ                                  | Очень слабое                         | НИ                                          | $1,85E-11$                       |
| BSPSMA/CD3-400                        | CD3-VH-G4                    | НИ                                  | Очень слабое                         | НИ                                          | Очень слабое                     |
| BSPSMA/CD3-004                        | CD3-VH-G5                    | $2,15E-11$                          | $6,31E-12$                           | $1,15E-11$                                  | $1,34E-11$                       |
| BSPSMA/CD3-800                        | CD3-VH-G8                    | НИ                                  | НИ                                   | $9,27E-12$                                  | $1,76E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-900                        | CD3-VH-G9                    | НИ                                  | НИ                                   | $3,50E-12$                                  | $1,12E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-1000                       | CD3-VH-G10                   | НИ                                  | НИ                                   | $5,97E-12$                                  | $1,28E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-1100                       | CD3-VH-G11                   | НИ                                  | НИ                                   | $3,86E-12$                                  | $1,11E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-1300                       | CD3-VH-G13                   | $8,74E-12$                          | НИ                                   | НИ                                          | $2,31E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-1700                       | CD3-VH-G17                   | $7,37E-12$                          | $2,07E-12$                           | НИ                                          | $3,89E-12$                       |
| BSPSMA/CD3-005                        | CD3-VH-G20                   | $1,39E-11$                          | $8,32E-12$                           | НИ                                          | $6,11E-12$                       |

НИ=не исследовали

Пример 8. Биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 демонстрируют мощную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для определения эффективности иллюстративных биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 *in vivo* проводили исследования на мышах с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. Также проводили дополнительные исследования на мышах без иммунодефицита, которые несли ксенотрансплантаты рака предстательной железы мыши, сконструированные для экспрессии ПСМА человека.

Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 на ксенотрансплантатных моделях опухоли человека

Для оценки эффективности биспецифичных молекул против ПСМА/против CD3 *in vivo* в ксенотрансплантатных исследованиях опухолей человека мышам NOD scid gamma (NSG) (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн) совместно имплантировали мононуклеарные клетки периферической крови

(МКПК) человека вместе с клетками опухоли предстательной железы человека 22Rv1 или C4-2, которые эндогенно экспрессировали ПСМА.

Вкратце,  $4 \times 10^6$  клеток 22Rv1 или  $5 \times 10^6$  клеток C4-2 (MD Anderson, Техас) совместно имплантировали п.к. с  $1 \times 10^6$  МКПК человека (ReachBio, LLC., Сизтл, Вашингтон) в смеси 50:50 матрицы матригеля (BD Biosciences) в правый бок самцов мышей NSG. В исследовании 22Rv1 мышам и.п. вводили лечение 1 мкг BSPSMA/CD3-001 или изотипическим контролем в дни 0, 3 и 7 (фиг. 1). В исследовании C4-2 мышам и.п. вводили лечение 0,1 мг/кг BSPSMA/CD3-001, BSPSMA/CD3-003 или BSPSMA/CD3-005 в дни 0, 4 и 7 после имплантации опухоли.

На дополнительной ксеногенной модели биспецифичные молекулы против ПСМА/против CD3 исследовали на мышах с пересадкой гематопозитических CD34+ стволовых клеток человека. Вкратце, новорожденным мышам SIRPα BALB/c-Rag2- IL2γ- (BRG) пересаживали эмбриональные клетки печени hCD34+. Затем через 3-6 месяцев мышам SIRPα BRG с пересаженными hCD34 имплантировали клетки C4-2 ( $5 \times 10^6$  п.к. в матригеле). Через 8 дней мышам вводили лечение 10 мкг BSPSMA/CD3-004 или анти-тела изотипического контроля, после чего вводили дозы 2 раза/неделю в течение всего исследования.

Во всех исследованиях размер опухоли измеряли 2 раза/неделю с применением циркулей, и объем опухоли рассчитывали в виде:

$$\text{Объем} = (\text{длина} \times \text{ширина}^2)^2.$$

Как показывают результаты в табл. 9, все биспецифичные антитела, исследованные на ксеногенных моделях, описанных выше, являлись эффективными в отношении ингибирования роста опухоли по сравнению с лечением изотипическим контролем.

Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3  
на ксенотрансплантатной модели развившейся опухоли человека

Далее оценивали эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 в отношении подавления роста развившихся опухолей. Сначала мышам NSG и.п. инъецировали  $2,5 \times 10^6$  МКПК человека, чтобы обеспечить приживание Т-клеток человека. Через четырнадцать дней мышам совместно имплантировали клетки C4-2 и МКПК, как описано выше. Через 18 дней после имплантации опухоли и.п. вводили 20 мкг BSPSMA/CD3-002 или изотипического контроля и продолжали введение 2 раза/неделю в течение длительности исследования. Дополнительные МКПК вводили и.п. в дни 20 и 40 после имплантации опухоли.

Как показывают результаты в табл. 9, BSPSMA/CD3-002 продемонстрировал эффективность в отношении подавления роста развившихся опухолей, снижая рост опухоли на 95%.

Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3  
на модели опухоли без иммунодефицита

Дополнительно биспецифичные молекулы против ПСМА/против CD3 оценивали в отношении противоопухолевой активности на модели без иммунодефицита. Мышам, гуманизированным тремя цепями ( $\delta\gamma\epsilon$ ) CD3, а также ПСМА, имплантировали вариант линии клеток рака предстательной железы мыши TRAMP-C2, трансфицированный ПСМА человека.

До начала исследования нарабатывали вариант опухолевой линии клеток TRAMP-C2\_hPSMAv#1. Вкратце,  $7,5 \times 10^6$  клеток TRAMP-C2\_hPSMA имплантировали п.к. в правый бок самцов мышей, гуманизированных CD3 и ПСМА. Опухоль извлекали и разрезали на фрагменты размером 3 мм, а затем имплантировали в правый бок новых самцов гуманизированных мышей. После этого опухоли, возникшие из имплантированных фрагментов опухоли, собирали и измельчали до суспензии отдельных клеток. Затем данные клетки (TRAMP-C2\_hPSMAv#1) культивировали *in vitro* с селекцией G418. После этого  $4.10^6$  клеток данного варианта линии клеток имплантировали в правый бок самцов гуманизированных мышей ПСМА/CD3 для исследования эффективности биспецифичного антитела.

Гуманизированных мышей ПСМА/CD3, которым имплантировали RAMPC2\_hPSMAv#1, лечили 100 мкг или 10 мкг биспецифичного антитела против ПСМА/против CD3 BSPSMA/CD3-001 или BSPSMA/CD3-004 или изотипическим контролем 2 раза/неделю, начиная со дня имплантации опухоли. Также через 4 ч после инъекции определяли уровни цитокинов в сыворотке, а также уровни Т-клеток в селезенке. Исследование заканчивали в день 27.

Как показывают результаты в табл. 10, обе биспецифичные молекулы против ПСМА/против CD3 продемонстрировали эффективность в отношении значительного отсрочивания роста опухоли среди групп лечения. После лечения BSPSMA/CD3-001 наблюдалось дозозависимое высвобождение цитокинов. Минимальное высвобождение цитокинов наблюдалось после введения BSPSMA/CD3-004, возможно, в связи со слабым связыванием против CD3. BSPSMA/CD3-001 продемонстрировали противоопухолевую эффективность без истощения Т-клеток в селезенке.

Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3  
на развившихся опухолях на модели без иммунодефицита

Наконец, оценивали эффективность выбранных биспецифичных молекул против ПСМА/против CD3 в отношении снижения роста развившихся опухолей на гуманизированных мышах ПСМА/CD3. Клетки TRAMP-C2\_hPSMAv#1 трансплантировали гуманизированным мышам, как описано выше, и

100 мкг BPSMA/CD3-001 или изотипического контроля вводили и.п.2 раза/неделю через 14 дней после имплантации опухоли, когда размер опухолей варьировал от 50 до 100 мм<sup>3</sup>. Как показывают результаты в табл. 11, BPSMA/CD3-001 являлись эффективными на данной модели развившейся опухоли, демонстрируя снижение роста опухоли на 84% по сравнению с контрольной группой.

В заключение, биспецифичные антитела против ПСМА/против CD3 согласно настоящему изобретению демонстрируют мощную противоопухолевую эффективность на моделях опухоли с иммунодефицитом и без иммунодефицита. Дополнительно некоторые из исследованных биспецифичных антител (BPSMA/CD3-001 и 002) продемонстрировали высокую способность снижать объем развившихся опухолей.

Примечательно, что при отсутствии опухолевых клеток, экспрессирующих ПСМА, активация Т-клеток не наблюдалась.

Дополнительно у мышей, не несущих опухоли, через 4 ч после лечения биспецифичным антителом против ПСМАх CD3 отбирали образцы крови и определяли уровни цитокинов в сыворотке. Было определено временное увеличение уровней цитокинов, а именно интерферона-гамма (ИФН g), фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-6 (ИЛ-6), при этом временное увеличение являлось дозозависимым (фиг. 2A-2D).

С целью подтверждения специфичности биспецифичных антител мышам, гуманизированным в отношении как ПСМА, так и CD3, или мышам, гуманизированным в отношении одного CD3, вводили 100 мкг ПСМАх CD3 и изучали цитокины сыворотки (через 4 ч после введения дозы) и временную утрату Т-клеток в крови (через 24 ч после введения дозы). Лечение биспецифичным антителом против ПСМАх CD3 на гуманизированных Т-клетках мыши (100 мкг/мышь) вызывает резкое повышение уровня цитокинов (например, ИФНγ), а также временное снижение уровня циркулирующих Т-клеток (фиг. 3A, B). Данный результат воспроизводит изменения уровней цитокинов и Т-клеток, которые наблюдались на пациентах-людях, получавших лечение биспецифичными антителами против антигена опухоли х CD3.

Биспецифичные антитела против ПСМАх CD3 являются эффективными без истощения эффекторных Т-клеток в селезенке мышей со здоровой иммунной системой, как показано на фиг. 4A-C. Вкратце, гуманизированным в отношении ПСМА и CD3 мышам Velocigene® имплантировали опухоли, экспрессирующие чПСМА, и вводили лечение ПСМАх CD3 два раза в неделю. При конечном сборе Т-клетки присутствовали в нормальных количествах. В конце эксперимента изучали CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки и Treg в селезенке после лечения биспецифичным антителом против ПСМАх CD3 два раза в неделю в течение всего исследования. Мышам, гуманизированным в отношении ПСМА и CD3, имплантировали опухоли TRAMP-C2\_hPSMA и вводили дозы 100 мкг или 10 мкг ПСМАх CD3, начиная с дня 0. Популяции клеток в селезенке анализировали методом проточной цитометрии. Данные анализировали с применением дисперсионного анализа (ANOVA) в отношении любых значимых эффектов по сравнению с группой изотипического контроля, но какие-либо значимые различия обнаружены не были (фиг. 4A-C).

Таблица 9. Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 на ксенотрансплантатных моделях с иммунодефицитом

| Ксеногенная модель: подавление роста опухоли                                    |                                   |                                                         |                                                           |                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Модель опухоли/<br>Линия мышей                                                  | N количество мышей/группу лечения | Идентификатор биспецифичного антитела                   | Доза                                                      | Конечный объем опухоли (мм³), среднее ± CO        |
|                                                                                 |                                   |                                                         |                                                           |                                                   |
| 22Rv1/NSG                                                                       | 5                                 | BSPSMA/CD3-001                                          | 1,0 мкг/мышь в день 0, 3 и 7                              | 370 ± 270                                         |
|                                                                                 | 5                                 | Изотипический контроль                                  |                                                           | 1260 ± 730                                        |
| C4-/2 NSG                                                                       | 5                                 | BSPSMA/CD3-001                                          | 0,1 мг/кг в день 0, 4 и 7                                 | 0±0                                               |
|                                                                                 | 5                                 | BSPSMA/CD3-003                                          |                                                           | 0±0                                               |
|                                                                                 | 5                                 | BSPSMA/CD3-005                                          |                                                           | 0±0                                               |
|                                                                                 | 5                                 | Изотипический контроль                                  |                                                           | 960 ± 660                                         |
|                                                                                 |                                   |                                                         |                                                           |                                                   |
| C4-2/<br>SIRPα<br>Balb/c-<br>Rag2-<br>IL2γ-BRG<br>с<br>пересадкой<br>чCD34+ ГСК | 5                                 | BSPSMA/CD3-004                                          | 1,0 мкг/мышь 2 раза/неделю                                | 70 ± 60                                           |
|                                                                                 | 5                                 | Изотипический контроль                                  |                                                           | 260 ±180                                          |
| Ксеногенная модель: ингибирование роста развившихся опухолей                    |                                   |                                                         |                                                           |                                                   |
| Модель опухоли/<br>Линия мышей                                                  | N количество мышей/группу лечения | Идентификатор биспецифичного антитела Доза: 20 мкг/мышь | Рост опухоли (мм³) от начала лечения Доза: (среднее ± CO) | % Снижения роста опухоли по сравнению с контролем |
| C4-2/ NSG                                                                       | 5                                 | BSPSMA/CD3-002                                          | 60±100                                                    | 95%                                               |
|                                                                                 | 4                                 | Изотипический контроль                                  | 1170±600                                                  | (-)                                               |

Таблица 10. Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 на сингенетических моделях без иммунодефицита

|                                                                  |                                       |                                |                                   |                                                               | Средние концентрации цитокинов в сыворотке (пг/мл) |      |      |          |      | Уровень Т-клеток в селезенке, % (среднее $\pm$ CO )* |                  |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|------|----------|------|------------------------------------------------------|------------------|
| Модель опухоли/Линия мышей                                       | Идентификатор биспецифичного антитела | Доза (мкг/мышь) 2 раза/неделю* | N количество мышей/группу лечения | Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) в день 27 (среднее $\pm$ CO) | ИФNg                                               | ИПОa | ИЛ 2 | ИЛ-12p70 | ИЛ 6 | CD4 <sup>+</sup>                                     | CD8 <sup>+</sup> |
| TRAMP-C2/<br>PSMA <sup>Hum</sup> /Hum<br>CD3 <sup>Hum</sup> /Hum | BSPSMA/CD3-001                        | 100                            | 4                                 | 260 $\pm$ 250                                                 | 130                                                | 180  | 150  | 70       | 20   | 6,0 $\pm$ 1,0                                        | 13,0 $\pm$ 3,0   |
|                                                                  |                                       | 10                             | 6                                 | 600 $\pm$ 330                                                 | 80                                                 | 140  | 140  | 30       | 1130 | 7,0 $\pm$ 2,0                                        | 14,0 $\pm$ 3,0   |
|                                                                  | BSPSMA/CD3-004                        | 100                            | 4                                 | 50 $\pm$ 60                                                   | 30                                                 | 60   | 60   | 40       | 370  | 8,0 $\pm$ 1,0                                        | 12,0 $\pm$ 2,0   |
|                                                                  |                                       | 10                             | 5                                 | 380 $\pm$ 650                                                 | 10                                                 | 50   | 50   | 10       | 330  | 8,0 $\pm$ 3,0                                        | 14,0 $\pm$ 4,0   |
|                                                                  | Изотипический контроль                |                                |                                   |                                                               |                                                    |      |      |          |      |                                                      |                  |
|                                                                  |                                       | 100                            | 5                                 | 1740 $\pm$ 560                                                | 4                                                  | 30   | 30   | 10       | 230  | 5,0 $\pm$ 1,0                                        | 8,0 $\pm$ 2,0    |

\* Мышам вводили антитело или изотипический контроль 2 раза/неделю, начиная со дня имплантации опухоли

# Измерено в виде процента CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> клеток в селезенке от количества живых клеток MCD45<sup>+</sup>

Таблица 11. Эффективность биспецифичных антител против ПСМА/против CD3 в отношении подавления роста развившейся опухоли на сингенетической модели без иммунодефицита

| Противоопухолевая эффективность на модели без иммунодефицита, развившиеся опухоли |                                                          |                                                                      |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Модель опухоли/<br>Линия мышей                                                    | Идентификатор биспецифичного антитела Доза: 100 мкг/мышь | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) от начала лечения (среднее $\pm$ CO) | % Снижения роста опухоли по сравнению с контролем |
| TRAMP-C2/<br>ПСМА Hum/hum<br>CD3 Hum/Hum                                          | BSFPSMA/CD3-001                                          | 170 $\pm$ 170                                                        | 84                                                |
|                                                                                   | Изотипический контроль                                   | 740 $\pm$ 570                                                        | (-)                                               |

**Пример 9. Нароботка антител против CD3.**

Антитела против CD3 получали иммунизацией генно-инженерной мыши, содержащей ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека, клетками, экспрессирующими CD3, или ДНК, кодирующей CD3. Иммунный ответ на антитело контролировали посредством CD3-специфичного иммуноанализа. Когда желаемый иммунный ответ был достигнут, спленомы отбирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования линий клеток гибридомы. Проводили скрининг и отбор линий клеток гибридомы для идентификации линий клеток, которые образуют CD3-специфичные антитела. С применением данной методики получали некоторые химерные антитела против CD3 (т.е. антитела, содержащие варибельные домены человека и константные домены мыши). Помимо этого, некоторые полностью человеческие антитела против CD3 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в публикации US 2007/0280945 A1.

Некоторые биологические свойства иллюстративных антител против CD3, наработанных согласно способам данного примера, подробно описаны в примерах настоящего документа.

**Пример 10. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот варибельной области тяжелой и легкой цепей.**

В табл. 12 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител против CD3 согласно настоящему изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 13. Способы получения антител против CD3, раскрытых в настоящем документе, можно также найти в публикации US 2014/0088295.

Таблица 12. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

| Обозначение<br>антитела | SEQ ID NO: |       |     |       |      |        |       |       |
|-------------------------|------------|-------|-----|-------|------|--------|-------|-------|
|                         | HCVR       | HCDR1 |     | HCDR3 | LCVR | LCDR11 | LCDR2 | LCDR3 |
| H1H2712N                | 154        | 156   | 158 | 160   | 162  | 164    | 166   | 168   |
| H1M2692N                | 170        | 172   | 174 | 176   | 178  | 180    | 182   | 184   |
| H1M3542N                | 186        | 188   | 190 | 192   | 194  | 196    | 198   | 200   |
| H1M3544N                | 202        | 204   | 206 | 208   | 210  | 212    | 214   | 216   |
| H1M3549N                | 218        | 220   | 222 | 224   | 226  | 228    | 230   | 232   |
| H1M3613N                | 234        | 236   | 238 | 240   | 242  | 244    | 246   | 248   |
| H2M2689N                | 250        | 252   | 254 | 256   | 258  | 260    | 262   | 264   |
| H2M2690N                | 266        | 268   | 270 | 272   | 274  | 276    | 278   | 280   |
| H2M2691N                | 282        | 284   | 286 | 288   | 290  | 292    | 294   | 296   |
| H2M2704N                | 298        | 300   | 302 | 304   | 306  | 308    | 310   | 312   |
| H2M2705N                | 314        | 316   | 318 | 320   | 322  | 324    | 326   | 328   |
| H2M2706N                | 330        | 332   | 334 | 336   | 338  | 340    | 342   | 344   |
| H2M2707N                | 346        | 348   | 350 | 352   | 354  | 356    | 358   | 360   |
| H2M2708N                | 362        | 364   | 366 | 368   | 370  | 372    | 374   | 376   |
| H2M2709N                | 378        | 380   | 382 | 384   | 386  | 388    | 390   | 392   |
| H2M2710N                | 394        | 396   | 398 | 400   | 402  | 404    | 406   | 408   |
| H2M2711N                | 410        | 412   | 414 | 416   | 418  | 420    | 422   | 424   |
| H2M2774N                | 426        | 428   | 430 | 432   | 434  | 436    | 438   | 440   |
| H2M2775N                | 442        | 444   | 446 | 448   | 450  | 452    | 454   | 456   |
| H2M2776N                | 458        | 460   | 462 | 464   | 466  | 468    | 470   | 472   |
| H2M2777N                | 474        | 476   | 478 | 480   | 482  | 484    | 486   | 488   |
| H2M2778N                | 490        | 492   | 494 | 496   | 498  | 500    | 502   | 504   |
| H2M2779N                | 506        | 508   | 510 | 512   | 514  | 516    | 518   | 520   |
| H2M2789N                | 522        | 524   | 526 | 528   | 530  | 532    | 534   | 536   |
| H2M2862N                | 538        | 540   | 542 | 544   | 546  | 548    | 550   | 552   |
| H2M2885N                | 554        | 556   | 558 | 560   | 562  | 564    | 566   | 568   |
| H2M2886N                | 570        | 572   | 574 | 576   | 578  | 580    | 582   | 584   |
| H2M3540N                | 586        | 588   | 590 | 592   | 594  | 596    | 598   | 600   |
| H2M3541N                | 602        | 604   | 606 | 608   | 610  | 612    | 614   | 616   |
| H2M3543N                | 618        | 620   | 622 | 624   | 626  | 628    | 630   | 632   |
| H2M3547N                | 634        | 636   | 638 | 640   | 642  | 644    | 646   | 648   |
| H2M3548N                | 650        | 652   | 654 | 656   | 658  | 660    | 662   | 664   |
| H2M3563N                | 666        | 668   | 670 | 672   | 674  | 676    | 678   | 680   |
| H1H5751P                | 682        | 684   | 686 | 688   | 690  | 692    | 694   | 696   |
| H1H5752P                | 698        | 700   | 702 | 704   | 706  | 708    | 710   | 712   |
| H1H5753B                | 714        | 716   | 718 | 720   | 722  | 724    | 726   | 728   |
| H1H5754B                | 730        | 732   | 734 | 736   | 738  | 740    | 742   | 744   |
| H1H5755B                | 746        | 748   | 750 | 752   | 754  | 756    | 758   | 760   |
| H1H5756B                | 762        | 764   | 766 | 768   | 770  | 772    | 774   | 776   |
| H1H5757B                | 778        | 780   | 782 | 784   | 786  | 788    | 790   | 792   |

## 038603

|            |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| H1H5758B   | 794  | 796  | 798  | 800  | 802  | 804  | 806  | 808  |
| H1H5761P   | 810  | 812  | 814  | 816  | 818  | 820  | 822  | 824  |
| H1H5763P   | 826  | 828  | 830  | 832  | 834  | 836  | 838  | 840  |
| H1H5764P   | 842  | 844  | 846  | 848  | 850  | 852  | 854  | 856  |
| H1H5769P   | 858  | 860  | 862  | 864  | 866  | 868  | 870  | 872  |
| H1H5771P   | 874  | 876  | 878  | 880  | 882  | 884  | 886  | 888  |
| H1H5772P   | 890  | 892  | 894  | 896  | 898  | 900  | 902  | 904  |
| H1H5777P   | 906  | 908  | 910  | 912  | 914  | 916  | 918  | 920  |
| H1H5778P   | 922  | 924  | 926  | 928  | 930  | 932  | 934  | 936  |
| H1H5780P   | 938  | 940  | 942  | 944  | 946  | 948  | 950  | 952  |
| H1H5781P   | 954  | 956  | 958  | 960  | 962  | 964  | 966  | 968  |
| H1H5782P   | 970  | 972  | 974  | 976  | 978  | 980  | 982  | 984  |
| H1H5785B   | 986  | 988  | 990  | 992  | 994  | 996  | 998  | 1000 |
| H1H5786B   | 1002 | 1004 | 1006 | 1008 | 1010 | 1012 | 1014 | 1016 |
| H1H5788P   | 1018 | 1020 | 1022 | 1024 | 1026 | 1028 | 1030 | 1032 |
| H1H5790B   | 1034 | 1036 | 1038 | 1040 | 1042 | 1044 | 1046 | 1048 |
| H1H5791B   | 1050 | 1052 | 1054 | 1056 | 1058 | 1060 | 1062 | 1064 |
| H1H5792B   | 1066 | 1068 | 1070 | 1072 | 1074 | 1076 | 1078 | 1080 |
| H1H5793B   | 1082 | 1084 | 1086 | 1088 | 1090 | 1092 | 1094 | 1096 |
| H1H5795B   | 1098 | 1100 | 1102 | 1104 | 1106 | 1108 | 1110 | 1112 |
| H1H5796B   | 1114 | 1116 | 1118 | 1120 | 1122 | 1124 | 1126 | 1128 |
| H1H5797B   | 1130 | 1132 | 1134 | 1136 | 1138 | 1140 | 1142 | 1144 |
| H1H5798B   | 1146 | 1148 | 1150 | 1152 | 1154 | 1156 | 1158 | 1160 |
| H1H5799P   | 1162 | 1164 | 1166 | 1168 | 1170 | 1172 | 1174 | 1176 |
| H1H5801B   | 1178 | 1180 | 1182 | 1184 | 1186 | 1188 | 1190 | 1192 |
| H1H7194B   | 1194 | 1196 | 1198 | 1200 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7195B   | 1202 | 1204 | 1206 | 1208 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7196B   | 1210 | 1212 | 1214 | 1216 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7198B   | 1218 | 1220 | 1222 | 1224 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7203B   | 1226 | 1228 | 1230 | 1232 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7204B   | 1234 | 1236 | 1238 | 1240 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7208B   | 1242 | 1244 | 1246 | 1248 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7211B   | 1250 | 1252 | 1254 | 1256 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7221B   | 1258 | 1260 | 1262 | 1264 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7223B   | 1266 | 1268 | 1270 | 1272 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7226B   | 1274 | 1276 | 1278 | 1280 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7232B   | 1282 | 1284 | 1286 | 1288 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7233B   | 1290 | 1292 | 1294 | 1296 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7241B   | 1298 | 1300 | 1302 | 1304 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7242B   | 1306 | 1308 | 1310 | 1312 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7250B   | 1314 | 1316 | 1318 | 1320 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7251B   | 1322 | 1324 | 1326 | 1328 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7254B   | 1330 | 1332 | 1334 | 1336 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7258B   | 1338 | 1340 | 1342 | 1344 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7269B   | 1346 | 1348 | 1350 | 1352 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1H7279B   | 1354 | 1356 | 1358 | 1360 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1xH7221G  | 1362 | 1364 | 1366 | 1368 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1xH7221G3 | 1370 | 1372 | 1374 | 1376 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |
| H1xH7221G5 | 1378 | 1380 | 1382 | 1384 | 1386 | 1388 | 1390 | 1392 |

Таблица 13. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

| Обозначение<br>антитела | SEQ ID NO: |       |       |       |      |       |       |       |
|-------------------------|------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
|                         | HCVR       | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| H1H2712N                | 153        | 155   | 157   | 159   | 161  | 163   | 165   | 167   |
| H1M2692N                | 169        | 171   | 173   | 175   | 177  | 179   | 181   | 183   |
| H1M3542N                | 185        | 187   | 189   | 191   | 193  | 195   | 197   | 199   |
| H1M3544N                | 201        | 203   | 205   | 207   | 209  | 211   | 213   | 215   |
| H1M3549N                | 217        | 219   | 221   | 223   | 225  | 227   | 229   | 231   |
| H1M3613N                | 233        | 235   | 237   | 239   | 241  | 243   | 245   | 247   |
| H2M2689N                | 249        | 251   | 253   | 255   | 257  | 259   | 261   | 263   |
| H2M2690N                | 265        | 267   | 269   | 271   | 273  | 275   | 277   | 279   |
| H2M2691N                | 281        | 283   | 285   | 287   | 289  | 291   | 293   | 295   |
| H2M2704N                | 297        | 299   | 301   | 303   | 305  | 307   | 309   | 311   |
| H2M2705N                | 313        | 315   | 317   | 319   | 321  | 323   | 325   | 327   |
| H2M2706N                | 329        | 331   | 333   | 335   | 337  | 339   | 341   | 343   |
| H2M2707N                | 345        | 347   | 349   | 351   | 353  | 355   | 357   | 359   |
| H2M2708N                | 361        | 363   | 365   | 367   | 369  | 371   | 373   | 375   |
| H2M2709N                | 377        | 379   | 381   | 383   | 385  | 387   | 389   | 391   |
| H2M2710N                | 393        | 395   | 397   | 399   | 401  | 403   | 405   | 407   |
| H2M2711N                | 409        | 411   | 413   | 415   | 417  | 419   | 421   | 423   |
| H2M2774N                | 425        | 427   | 429   | 431   | 433  | 435   | 437   | 439   |
| H2M2775N                | 441        | 443   | 445   | 447   | 449  | 451   | 453   | 455   |
| H2M2776N                | 457        | 459   | 461   | 463   | 465  | 467   | 469   | 471   |
| H2M2777N                | 473        | 475   | 477   | 479   | 481  | 483   | 485   | 487   |
| H2M2778N                | 489        | 491   | 493   | 495   | 497  | 499   | 501   | 503   |
| H2M2779N                | 505        | 507   | 509   | 511   | 513  | 515   | 517   | 519   |
| H2M2789N                | 521        | 523   | 525   | 527   | 529  | 531   | 533   | 535   |
| H2M2862N                | 537        | 539   | 541   | 543   | 545  | 547   | 549   | 551   |
| H2M2885N                | 553        | 555   | 557   | 559   | 561  | 563   | 565   | 567   |
| H2M2886N                | 569        | 571   | 573   | 575   | 577  | 579   | 581   | 583   |
| H2M3540N                | 585        | 587   | 589   | 591   | 593  | 595   | 597   | 599   |
| H2M3541N                | 601        | 603   | 605   | 607   | 609  | 611   | 613   | 615   |
| H2M3543N                | 617        | 619   | 621   | 623   | 625  | 627   | 629   | 631   |
| H2M3547N                | 633        | 635   | 637   | 639   | 641  | 643   | 645   | 647   |
| H2M3548N                | 649        | 651   | 653   | 655   | 657  | 659   | 661   | 663   |
| H2M3563N                | 665        | 667   | 669   | 671   | 673  | 675   | 677   | 679   |
| H1H5751P                | 681        | 683   | 685   | 687   | 689  | 691   | 693   | 695   |
| H1H5752P                | 697        | 699   | 701   | 703   | 705  | 707   | 709   | 711   |
| H1H5753B                | 713        | 715   | 717   | 719   | 721  | 723   | 725   | 727   |
| H1H5754B                | 729        | 731   | 733   | 735   | 737  | 739   | 741   | 743   |
| H1H5755B                | 745        | 747   | 749   | 751   | 753  | 755   | 757   | 759   |
| H1H5756B                | 761        | 763   | 765   | 767   | 769  | 771   | 773   | 775   |
| H1H5757B                | 777        | 779   | 781   | 783   | 785  | 787   | 789   | 791   |
| H1H5758B                | 793        | 795   | 797   | 799   | 801  | 803   | 805   | 807   |
| H1H5761P                | 809        | 811   | 813   | 815   | 817  | 819   | 821   | 823   |
| H1H5763P                | 825        | 827   | 829   | 831   | 833  | 835   | 837   | 839   |
| H1H5764P                | 841        | 843   | 845   | 847   | 849  | 851   | 853   | 855   |
| H1H5769P                | 857        | 859   | 861   | 863   | 865  | 867   | 869   | 871   |
| H1H5771P                | 873        | 875   | 877   | 879   | 881  | 883   | 885   | 887   |
| H1H5772P                | 889        | 891   | 893   | 895   | 897  | 899   | 901   | 903   |
| H1H5777P                | 905        | 907   | 909   | 911   | 913  | 915   | 917   | 919   |
| H1H5778P                | 921        | 923   | 925   | 927   | 929  | 931   | 933   | 935   |
| H1H5780P                | 937        | 939   | 941   | 943   | 945  | 947   | 949   | 951   |
| H1H5781P                | 953        | 955   | 957   | 959   | 961  | 963   | 965   | 967   |
| H1H5782P                | 969        | 971   | 973   | 975   | 977  | 979   | 981   | 983   |
| H1H5785B                | 985        | 987   | 989   | 991   | 993  | 995   | 997   | 999   |
| H1H5786B                | 1001       | 1003  | 1005  | 1007  | 1009 | 1011  | 1013  | 1015  |
| H1H5788P                | 1017       | 1019  | 1021  | 1023  | 1025 | 1027  | 1029  | 1031  |

|            |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| H1H5790B   | 1033 | 1035 | 1037 | 1039 | 1041 | 1043 | 1045 | 1047 |
| H1H5791B   | 1049 | 1051 | 1053 | 1055 | 1057 | 1059 | 1061 | 1063 |
| H1H5792B   | 1065 | 1067 | 1069 | 1071 | 1073 | 1075 | 1077 | 1079 |
| H1H5793B   | 1081 | 1083 | 1085 | 1087 | 1089 | 1091 | 1093 | 1095 |
| H1H5795B   | 1097 | 1099 | 1101 | 1103 | 1105 | 1107 | 1109 | 1111 |
| H1H5796B   | 1113 | 1115 | 1117 | 1119 | 1121 | 1123 | 1125 | 1127 |
| H1H5797B   | 1129 | 1131 | 1133 | 1135 | 1137 | 1139 | 1141 | 1143 |
| H1H5798B   | 1145 | 1147 | 1149 | 1151 | 1153 | 1155 | 1157 | 1159 |
| H1H5799B   | 1161 | 1163 | 1165 | 1167 | 1169 | 1171 | 1173 | 1175 |
| H1H5801B   | 1177 | 1179 | 1181 | 1183 | 1185 | 1187 | 1189 | 1191 |
| H1H7194B   | 1193 | 1195 | 1197 | 1199 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7195B   | 1201 | 1203 | 1205 | 1207 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7196B   | 1209 | 1211 | 1213 | 1215 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7198B   | 1217 | 1219 | 1221 | 1223 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7203B   | 1225 | 1227 | 1229 | 1231 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7204B   | 1233 | 1235 | 1237 | 1239 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7208B   | 1241 | 1243 | 1245 | 1247 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7211B   | 1249 | 1251 | 1253 | 1255 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7221B   | 1257 | 1259 | 1261 | 1263 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7223B   | 1265 | 1267 | 1269 | 1271 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7226B   | 1273 | 1275 | 1277 | 1279 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7232B   | 1281 | 1283 | 1285 | 1287 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7233B   | 1289 | 1291 | 1293 | 1295 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7241B   | 1297 | 1299 | 1301 | 1303 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7242B   | 1305 | 1307 | 1309 | 1311 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7250B   | 1313 | 1315 | 1317 | 1319 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7251B   | 1321 | 1323 | 1325 | 1327 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7254B   | 1329 | 1331 | 1333 | 1335 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7258B   | 1337 | 1339 | 1341 | 1343 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7269B   | 1345 | 1347 | 1349 | 1351 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1H7279B   | 1353 | 1355 | 1357 | 1359 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1xH7221G  | 1361 | 1363 | 1365 | 1367 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1xH7221G3 | 1369 | 1371 | 1373 | 1375 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |
| H1xH7221G5 | 1377 | 1379 | 1381 | 1383 | 1385 | 1387 | 1389 | 1391 |

Антитела, как правило, обозначаются в настоящем документе согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M" и т.д.), за которой следует числовой идентификатор (например, "2712", "2692" и т.д., как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "P", "N" или "B". Таким образом, согласно данной номенклатуре антитело могут называть в настоящем документе как, например, "H1H2712N", "H1M2692N", "H2M2689N" и т.д. Приставки H1H, H1M и H2M в обозначениях антител, использованных в настоящем документе, указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H1H" содержит Fc IgG1 человека, антитело "H1M" содержит Fc IgG1 мыши и антитело "H2M" содержит Fc IgG2 мыши (все переменные области являются полностью человеческими, что обозначено первым "H" в обозначении антитела). Как понимает средний специалист в данной области техники, антитело, которое характеризуется конкретным изотипом Fc, можно преобразовать в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно преобразовать в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, представленными в табл. 1, останутся теми же, и свойства связывания, как ожидают, будут идентичными или по существу подобными вне зависимости от природы Fc-домена.

В табл. 14 и 15 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (табл. 14) и переменных областей легкой цепи (табл. 15) и их соответствующих CDR дополнительных HCVR и LCVR против CD3, подходящих для биспецифичных антител против PCMA x против CD3 согласно настоящему изобретению.

Таблица 14. Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи

| Идентификатор тяжелой цепи | SEQ ID NO |       |       |       |
|----------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                            | HCVR      | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 |
| CD3-VH-AA                  | 1394      | 1396  | 1398  | 1400  |
| CD3-VH-B                   | 1410      | 1412  | 1414  | 1416  |
| CD3-VH-C                   | 1426      | 1428  | 1430  | 1432  |
| CD3-VH-D                   | 1442      | 1444  | 1446  | 1448  |
| CD3-VH-E                   | 1458      | 1460  | 1462  | 1464  |
| CD3-VH-F <sup>#</sup>      | 1473      | 1474  | 1475  | 1476  |

Таблица 15. Аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи

| Идентификатор легкой цепи | SEQ ID NO |       |       |       |
|---------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                           | LCVR      | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| CD3-VL-AA                 | 1402      | 1404  | 1406  | 1408  |
| CD3-VL-B                  | 1418      | 1420  | 1422  | 1424  |
| CD3-VL-C                  | 1434      | 1436  | 1438  | 1440  |
| CD3-VL-D                  | 1450      | 1452  | 1454  | 1456  |
| CD3-VL-E                  | 1466      | 1468  | 1470  | 1472  |
| CD3-VL-F <sup>#</sup>     | 1477      | 1478  | 1479  | 1480  |

Варибельные области тяжелой и легкой цепей CD3-VH-F и CD3-VL-F получали из антитела против CD3, обозначенного "L2K", представленного в публикации WO 2004/106380.

Помимо этого, в табл. 16 и 17 представлены идентификаторы последовательности нуклеотидных последовательностей, кодирующих варибельные области тяжелой цепи (табл. 16) и варибельные области легкой цепи (табл. 17), и их соответствующих CDR дополнительных HCVR и LCVR против CD3, подходящих для биспецифичных антител против ПСМА x против CD3 согласно настоящему изобретению.

Таблица 16. Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности варибельной области тяжелой цепи

| Идентификатор тяжелой цепи | SEQ ID NO |       |       |       |
|----------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                            | HCVR      | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 |
| CD3-VH-AA                  | 1393      | 1395  | 1397  | 1399  |
| CD3-VH-B                   | 1409      | 1411  | 1413  | 1415  |
| CD3-VH-C                   | 1425      | 1427  | 1429  | 1431  |
| CD3-VH-D                   | 1441      | 1443  | 1445  | 1447  |
| CD3-VH-E                   | 1457      | 1459  | 1461  | 1463  |

Таблица 17. Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности варибельной области легкой цепи

| Идентификатор легкой цепи | SEQ ID NO |       |       |       |
|---------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                           | LCVR      | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| CD3-VL-AA                 | 1401      | 1403  | 1405  | 1407  |
| CD3-VL-B                  | 1417      | 1419  | 1421  | 1423  |
| CD3-VL-C                  | 1433      | 1435  | 1437  | 1439  |
| CD3-VL-D                  | 1449      | 1451  | 1453  | 1455  |
| CD3-VL-E                  | 1465      | 1467  | 1469  | 1471  |

Контрольные конструкции, использованные в следующих примерах

Различные контрольные конструкции (антитела против CD3) были включены в следующие эксперименты для целей сравнения: "ОКТ-3", моноклональное антитело мыши против антигенов поверхности Т-клеток человека, доступное из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) под каталожным № CRL-8001; и "SP34", коммерчески доступное моноклональное антитело мыши, полученное, например, в компании Biologend, Сан-Диего, Калифорния (кат. № 302914) или BD Pharmingen, кат. № 55052, реактивное против цепи эпислон ТЗ-комплекса на клетках Т-лимфоцитах человека.

Пример 11. Нарботка дополнительных антител против CD3.

Целью следующих процедур была идентификация антител, которые специфично распознают CD3 (корцептор Т-клетки) в качестве антигена.

Пул антител против CD3 получали в генетически модифицированных мышах. Вкратце, мышей иммунизировали антигеном CD3 и набирали В-клетки, которые содержали разнообразные реаранжировки VH человека, с целью экспрессии разнообразного репертуара высокоаффинных специфичных к антигену антител. Антитела, описанные в табл. 18-21, содержали одинаковую последовательность легкой цепи VK1-39JK5 (LCVR, представленная в SEQ ID NO: 1386).

Наработанные антитела исследовали в отношении аффинности к антигену CD3 человека и яванского макака в анализе связывания *in vitro*, и, например, одно антитело против CD3, обозначенное CD3-VH-P (HCVR, представленная в SEQ ID NO: 1634), было идентифицировано среди нескольких других, которое, как было обнаружено, связывалось с CD3 как человека, так и яванского макака, и которое характеризовалось аффинностью EC<sub>50</sub> от 1 до 40 нМ, что было определено в процессе титрования методом FACS клеток Юркат и Т-клеток яванского макака соответственно. См., например, эксперименты по связыванию методом FACS, описанные в примере 5.

Затем идентифицировали аминокислотные остатки зародышевой линии CD3-VH-P и конструировали антитело, обозначенное "CD3-VH-G", которое содержало исключительно каркасные участки зароды-

шевой линии. Другие производные антител конструировали с применением хорошо известных методик молекулярного клонирования для замены аминокислотных остатков поэтапным способом на основании различий между зародышевой последовательностью и последовательностью CD3-VH-P. Каждому производному антитела дано числовое обозначение "CD3-VH-G", см. табл. 18.

В то время как CD3-VH-G и некоторые другие сконструированные антитела сохраняли свои аффинности связывания, что видно в анализах FACS, некоторые антитела против CD3 связывались с CD3 человека или яванского макака *in vitro* с от слабой аффинности связывания до отсутствия измеряемой аффинности связывания, например  $EC_{50}$  40 нМ. Затем исследовали аффинности связывания, кинетику связывания и другие биологические свойства для выяснения профилей токсичности и фармакокинетики (pK) биспецифичных антител, включая иллюстративные антитела против CD3, наработанные согласно способам данного примера, которые подробно описаны в примерах настоящего документа.

Пример 12. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей (последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот CDR).

В табл. 18 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и CDR выбранных антител против CD3 согласно настоящему изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 19.

Последовательности аминокислот и нуклеиновой кислоты определяли для каждой последовательности тяжелой цепи антитела. Каждой тяжелой цепи антитела, полученной из последовательности зародышевой линии (SEQ ID NO: 1662), присваивали обозначение номера "G" для единообразия номенклатуры. В табл. 2 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и CDR сконструированных антител против CD3 согласно настоящему изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 19. Идентификаторы последовательностей аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельной области легкой цепи и CDR также представлены ниже в табл. 20 и 21 соответственно.

Таблица 18. Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи

| Обозначение<br>антитела CD3-VH | SEQ ID NO: |      |      |      |
|--------------------------------|------------|------|------|------|
|                                | HCVR       | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| CD3-VH-G                       | 1482       | 1484 | 1486 | 1488 |
| CD3-VH-G2                      | 1490       | 1492 | 1494 | 1496 |
| CD3-VH-G3                      | 1498       | 1500 | 1502 | 1504 |
| CD3-VH-G4                      | 1506       | 1508 | 1510 | 1512 |
| CD3-VH-G5                      | 1514       | 1516 | 1518 | 1520 |
| CD3-VH-G8                      | 1522       | 1524 | 1526 | 1528 |
| CD3-VH-G9                      | 1530       | 1532 | 1534 | 1536 |
| CD3-VH-G10                     | 1538       | 1540 | 1542 | 1544 |
| CD3-VH-G11                     | 1546       | 1548 | 1550 | 1552 |
| CD3-VH-G12                     | 1554       | 1556 | 1558 | 1560 |
| CD3-VH-G13                     | 1562       | 1564 | 1566 | 1568 |
| CD3-VH-G14                     | 1570       | 1572 | 1574 | 1576 |
| CD3-VH-G15                     | 1578       | 1580 | 1582 | 1584 |
| CD3-VH-G16                     | 1586       | 1588 | 1590 | 1592 |
| CD3-VH-G17                     | 1594       | 1596 | 1598 | 1600 |
| CD3-VH-G18                     | 1602       | 1604 | 1606 | 1608 |
| CD3-VH-G19                     | 1610       | 1612 | 1614 | 1616 |
| CD3-VH-G20                     | 1618       | 1620 | 1622 | 1624 |
| CD3-VH-G21                     | 1626       | 1628 | 1630 | 1632 |
| CD3-VH-P                       | 1634       | 1636 | 1638 | 1640 |

Таблица 19. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты тяжелой цепи

| Обозначение<br>антитела CD3-VH | SEQ ID NO: |      |      |      |
|--------------------------------|------------|------|------|------|
|                                | HCVR       | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| CD3-VH-G                       | 1481       | 1483 | 1485 | 1487 |
| CD3-VH-G2                      | 1489       | 1491 | 1493 | 1495 |
| CD3-VH-G3                      | 1497       | 1499 | 1501 | 1503 |
| CD3-VH-G4                      | 1505       | 1507 | 1509 | 1511 |
| CD3-VH-G5                      | 1513       | 1515 | 1517 | 1519 |
| CD3-VH-G8                      | 1521       | 1523 | 1525 | 1527 |
| CD3-VH-G9                      | 1529       | 1531 | 1533 | 1535 |
| CD3-VH-G10                     | 1537       | 1539 | 1541 | 1543 |
| CD3-VH-G11                     | 1545       | 1547 | 1549 | 1551 |
| CD3-VH-G12                     | 1553       | 1555 | 1557 | 1559 |
| CD3-VH-G13                     | 1561       | 1563 | 1565 | 1567 |
| CD3-VH-G14                     | 1569       | 1571 | 1573 | 1575 |
| CD3-VH-G15                     | 1577       | 1579 | 1581 | 1583 |
| CD3-VH-G16                     | 1585       | 1587 | 1589 | 1591 |
| CD3-VH-G17                     | 1593       | 1595 | 1597 | 1599 |
| CD3-VH-G18                     | 1601       | 1603 | 1605 | 1607 |
| CD3-VH-G19                     | 1609       | 1611 | 1613 | 1615 |
| CD3-VH-G20                     | 1617       | 1619 | 1621 | 1623 |
| CD3-VH-G21                     | 1625       | 1627 | 1629 | 1631 |
| CD3-VH-P                       | 1633       | 1635 | 1637 | 1639 |

Таблица 20. Идентификаторы аминокислотных последовательностей легкой цепи

| Обозначение<br>антитела | SEQ ID NO: |      |      |      |
|-------------------------|------------|------|------|------|
|                         | LCVR       | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| VK1-39JK5               | 1386       | 1388 | 1390 | 1392 |

Таблица 21. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты легкой цепи

| Обозначение<br>антитела | SEQ ID NO: |      |      |      |
|-------------------------|------------|------|------|------|
|                         | LCVR       | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| VK1-39JK5               | 1385       | 1387 | 1389 | 1391 |

Антитело контроля 1, обозначенное "CD3-L2K", конструировали на основе известного антитела против CD3 (т.е. антитела против CD3 "L2K", представленного в публикации WO 2004/106380).

Антитело изотипического контроля, упоминаемое в примерах настоящего документа, представляет собой изотипически сходное антитело (модифицированный IgG4), которое взаимодействует с нерелевантным антигеном, т.е. антигеном FeID1.

Пример 13. Полученные методом поверхностного плазмонного резонанса аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека против CD3.

Аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека против CD3 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C с применением формата захвата антитела (табл. 22, 24 и 26) или формата захвата антигена (табл. 23, 25 и 27). Измерения проводили на приборе Biacore T200.

В формате захвата антитела поверхность сенсора Biacore дериватизировали антителами кролика против Fc мыши для захвата гибридомы (приставка антитела H1M или H2M) или антителами мыши против Fc человека для антител в формате IgG человека (приставка антитела H1H). Растворимый гетеродимерный белок CD3 (hCD3-эпсилон/hCD3-дельта; SEQ ID NO: 1652/1653) с Fc-меткой человека (hFcΔAdp/hFc; SEQ ID NO: 1683/1684) или Fc-меткой мыши (mFcΔAdp/mFc; SEQ ID NO: 1685/1686) инъецировали на поверхность с захваченным антителом и регистрировали ответ связывания. Гетеродимерный белок CD3 очищали с применением способа, описанного в публикации Davis et al. (US 2010/0331527).

В формате захвата антигена гетеродимерный белок CD3 захватывали с применением антитела кролика против Fc мыши или антитела мыши против Fc человека и соответствующие антитела инъецировали на захваченный антиген.

Антитела анализировали в их общепринятом двухвалентном формате (табл. 22-25) или в моновалентной 1-плечевой конфигурации (табл. 26, 27), в которой из антитела удаляли второй Fab и экспрессировали исключительно Fc-часть (CH2-CH3).

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством об-

работки и аппроксимации данных к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и диссоциационные периоды полувыведения ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости в виде:  $K_D(M) = k_d/k_a$ ; и  $t_{1/2}(\text{мин}) = (\ln 2)/(60 * k_d)$ . НИ=не исследовали; ОС=связывания не наблюдалось.

Таблица 22. Аффинности связывания гибридных МАТ (моноклональных антител) (H1M и H2M) на приборе Biacore

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антитела |                                        |                           |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Антитело                                                | $k_a$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) | $k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин.) |
| H2M2689N                                                | 7,73E+05                               | 3,23E-03                  | 4,18E-09         | 4                |
| H2M2690N                                                | 9,70E+03                               | 2,02E-04                  | 2,09E-08         | 57               |
| H2M2691N                                                | 1,03E+04                               | 2,07E-04                  | 2,01E-08         | 56               |
| H1M2692N                                                | 8,05E+03                               | 4,34E-04                  | 5,39E-08         | 27               |
| H2M2704N                                                | 3,46E+04                               | 6,92E-04                  | 2,00E-08         | 17               |
| H2M2705N                                                | 6,62E+04                               | 9,10E-04                  | 1,37E-08         | 13               |
| H2M2706N                                                | 3,29E+04                               | 4,44E-03                  | 1,35E-07         | 3                |
| H2M2707N                                                | 2,95E+04                               | 1,87E-03                  | 6,35E-08         | 6                |
| H2M2708N                                                | 6,94E+04                               | 6,12E-04                  | 8,82E-09         | 19               |
| H2M2709N                                                | НИ                                     | НИ                        | НИ               | НИ               |
| H2M2710N                                                | 6,72E+04                               | 7,53E-04                  | 1,12E-08         | 15               |
| H2M2711N                                                | 6,72E+04                               | 7,67E-04                  | 1,14E-08         | 15               |
| H1M2712N                                                | 9,32E+03                               | 2,19E-04                  | 2,35E-08         | 53               |
| H2M2774N                                                | 7,79E+04                               | 9,18E-04                  | 1,18E-08         | 13               |
| H2M2775N                                                | 6,97E+04                               | 6,26E-04                  | 8,98E-09         | 18               |
| H2M2776N                                                | 6,29E+04                               | 6,39E-04                  | 1,02E-08         | 18               |
| H2M2777N                                                | 3,70E+04                               | 1,63E-03                  | 4,39E-08         | 7                |
| H2M2778N                                                | 2,13E+04                               | 1,89E-04                  | 8,90E-09         | 61               |
| H2M2779N                                                | 2,18E+04                               | 2,28E-04                  | 1,05E-08         | 51               |
| H2M2789N                                                | НИ                                     | НИ                        | НИ               | НИ               |
| H2M2862N                                                | 3,72E+04                               | 3,00E-03                  | 8,07E-08         | 4                |
| H2M2885N                                                | 6,82E+04                               | 6,51E-04                  | 9,54E-09         | 18               |
| H2M2886N                                                | 7,29E+04                               | 6,53E-04                  | 8,96E-09         | 18               |
| H2M3540N                                                | 3,77E+04                               | 6,11E-04                  | 1,62E-08         | 19               |
| H2M3541N                                                | 7,10E+03                               | 1,35E-03                  | 1,89E-07         | 9                |
| H1M3542N                                                | 2,37E+04                               | 5,08E-04                  | 2,14E-08         | 23               |
| H2M3543N                                                | 7,53E+03                               | 2,26E-04                  | 3,00E-08         | 51               |
| H1M3544N                                                | 9,69E+03                               | 1,42E-04                  | 1,46E-08         | 82               |
| H2M3547N                                                | 2,18E+04                               | 3,47E-04                  | 1,59E-08         | 33               |
| H2M3548N                                                | 3,87E+04                               | 5,04E-03                  | 1,30E-07         | 2                |
| H1M3549N                                                | 1,18E+04                               | 9,19E-04                  | 7,76E-08         | 13               |
| H2M3563N                                                | 3,24E+04                               | 1,19E-04                  | 3,66E-09         | 97               |
| H1M3613N                                                | 1,93E+04                               | 3,04E-04                  | 1,57E-08         | 38               |

Таблица 23. Аффинности связывания гибридных МАТ (Н1М и Н2М) на приборе Вiasore

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антигена |                           |                          |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| Антитело                                                | $k_a$ (Мс <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (с <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T^{1/2}$ (мин.) |
| H2M2689N                                                | 1,71E+06                  | 9,97E-05                 | 5,83E-11         | 116              |
| H2M2690N                                                | 7,51E+04                  | 6,35E-06                 | 7,99E-11         | 1820             |
| H2M2691N                                                | 3,94E+04                  | 9,98E-06                 | 2,54E-10         | 1158             |
| H1M2692N                                                | 4,19E+04                  | 9,90E-06                 | 2,38E-10         | 1167             |
| H2M2704N                                                | 1,32E+06                  | 2,48E-04                 | 1,87E-10         | 47               |
| H2M2705N                                                | 2,43E+06                  | 3,41E-04                 | 1,40E-10         | 34               |
| H2M2706N                                                | 5,63E+05                  | 3,06E-04                 | 5,44E-10         | 38               |
| H2M2707N                                                | 3,99E+05                  | 2,85E-04                 | 7,15E-10         | 41               |
| H2M2708N                                                | 1,73E+06                  | 2,27E-04                 | 1,31E-10         | 51               |
| H2M2709N                                                | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H2M2710N                                                | 1,59E+06                  | 2,43E-04                 | 1,53E-10         | 48               |
| H2M2711N                                                | 1,59E+06                  | 2,40E-04                 | 1,51E-10         | 48               |
| H1M2712N                                                | 4,75E+04                  | 1,37E-05                 | 2,95E-10         | 846              |
| H2M2774N                                                | 2,49E+06                  | 3,36E-04                 | 1,35E-10         | 34               |
| H2M2775N                                                | 1,56E+06                  | 2,16E-04                 | 1,38E-10         | 53               |
| H2M2776N                                                | 1,58E+06                  | 2,22E-04                 | 1,40E-10         | 52               |
| H2M2777N                                                | 5,80E+05                  | 3,21E-04                 | 5,54E-10         | 36               |
| H2M2778N                                                | 1,50E+05                  | 6,57E-06                 | 4,68E-11         | 1758             |
| H2M2779N                                                | 1,28E+05                  | 1,23E-05                 | 9,38E-11         | 941              |
| H2M2789N                                                | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H2M2862N                                                | 5,91E+05                  | 3,21E-04                 | 5,41E-10         | 36               |
| H2M2885N                                                | 1,37E+06                  | 1,52E-04                 | 1,11E-10         | 76               |
| H2M2886N                                                | 1,42E+06                  | 1,36E-04                 | 9,56E-11         | 85               |
| H2M3540N                                                | 2,55E+06                  | 5,87E-04                 | 2,31E-10         | 20               |
| H2M3541N                                                | 8,40E+04                  | 1,16E-03                 | 1,38E-08         | 10               |
| H1M3542N                                                | 4,37E+05                  | 2,00E-04                 | 4,57E-10         | 58               |
| H2M3543N                                                | 1,22E+05                  | 7,96E-05                 | 6,53E-10         | 145              |
| H1M3544N                                                | 5,74E+04                  | 5,98E-05                 | 1,04E-09         | 193              |
| H2M3547N                                                | 4,70E-05                  | 1,00E-05                 | 2,15E-11         | 1155             |
| H2M3548N                                                | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1M3549N                                                | 2,81E+05                  | 2,89E-04                 | 1,03E-09         | 40               |
| H2M3563N                                                | 6,16E+05                  | 4,77E-05                 | 7,73E-11         | 242              |
| H1M3613N                                                | 2,20E+05                  | 9,60E-05                 | 4,35E-10         | 120              |

Таблица 24. Аффинности связывания Fc МАТ человека (H1H) на приборе Вiasore

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антитела |                                          |                          |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| Антитело                                                | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (с <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин.) |
| H1H2690N                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H2712N                                                | 3,06E+03                                 | 2,70E-04                 | 8,82E-08         | 43               |
| H1H5751P                                                | 4,01E+03                                 | 5,18E-04                 | 1,29E-07         | 22               |
| H1H5752P                                                | ОС                                       | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1H5753B                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H5755B                                                | 8,21E+03                                 | 4,72E-04                 | 5,75E-08         | 24               |
| H1H5756B                                                | 8,15E+03                                 | 2,66E-04                 | 3,26E-08         | 43               |
| H1H5757B                                                | 6,63E+03                                 | 7,85E-04                 | 1,18E-07         | 15               |
| H1H5758B                                                | 5,02E+03                                 | 1,17E-03                 | 2,33E-07         | 10               |
| H1H5761P                                                | 4,72E+03                                 | 2,44E-02                 | 5,16E-06         | 0                |
| H1H5763P                                                | 1,85E+04                                 | 5,40E-02                 | 2,92E-06         | 0                |
| H1H5764P                                                | 4,16E+03                                 | 1,59E-02                 | 3,82E-06         | 1                |
| H1H5769P                                                | 7,80E+03                                 | 9,41E-04                 | 1,21E-07         | 12               |
| H1H5771P                                                | 3,00E+04                                 | 6,26E-04                 | 2,09E-08         | 18               |
| H1H5772S                                                | 1,56E+04                                 | 1,55E-03                 | 9,96E-08         | 7                |
| H1H5777P                                                | 1,35E+04                                 | 3,02E-03                 | 2,24E-07         | 4                |
| H1H5778P                                                | 5,52E+03                                 | 1,54E-04                 | 2,78E-08         | 75               |
| H1H5780P                                                | 1,31E+04                                 | 3,99E-04                 | 3,04E-08         | 29               |
| H1H5781P                                                | 8,61E+03                                 | 4,97E-04                 | 5,77E-08         | 23               |
| H1H5782P                                                | ОС                                       | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1H5785B                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H5786B                                                | 1,26E+04                                 | 1,08E-03                 | 8,54E-08         | 11               |
| H1H5788P                                                | 2,88E+03                                 | 2,91E-04                 | 1,01E-07         | 40               |
| H1H5790B                                                | 1,82E+04                                 | 5,17E-04                 | 2,83E-08         | 22               |
| H1H5791B                                                | 1,09E+04                                 | 7,90E-04                 | 7,25E-08         | 15               |
| H1H5792B                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H5793B                                                | 8,54E+03                                 | 3,82E-04                 | 4,47E-08         | 30               |
| H1H5795B                                                | 1,73E+04                                 | 5,76E-04                 | 3,33E-08         | 20               |
| H1H5796B                                                | 1,47E+04                                 | 8,91E-04                 | 6,05E-08         | 13               |
| H1H5797B                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H5798B                                                | НИ                                       | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H5799P                                                | 1,36E+04                                 | 7,88E-03                 | 5,79E-07         | 1                |
| H1H5801B                                                | 6,57E+03                                 | 1,62E-03                 | 2,46E-07         | 7                |
| ОКТ3                                                    | 2,10E+06                                 | 2,00E+00                 | 1,00E-06         | 0,35 сек.        |

Таблица 25. Аффинности связывания Fc МАТ человека (H1N) на приборе Biacore

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антигена |                                       |                       |                           |                         |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| Антитело                                                | ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | kd (с <sup>-1</sup> ) | K <sub>D</sub> (молярная) | T <sub>1/2</sub> (мин.) |
| H1H2690N                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H2712N                                                | 8,93E+04                              | 8,68E-05              | 9,71E-10                  | 133                     |
| H1H5751P                                                | 7,24E+04                              | 2,47E-04              | 3,42E-09                  | 47                      |
| H1H5752P                                                | ОС                                    | ОС                    | ОС                        | ОС                      |
| H1H5753B                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H5755B                                                | 2,15E+05                              | 2,01E-04              | 9,36E-10                  | 57                      |
| H1H5756B                                                | 1,44E+05                              | 1,11E-04              | 7,67E-10                  | 105                     |
| H1H5757B                                                | 1,80E+05                              | 2,95E-04              | 1,64E-09                  | 39                      |
| H1H5758B                                                | 1,42E+05                              | 5,62E-04              | 3,97E-09                  | 21                      |
| H1H5761P                                                | 2,11E+05                              | 1,13E-02              | 5,34E-08                  | 1                       |
| H1H5763P                                                | 1,84E+05                              | 1,70E-02              | 9,24E-08                  | 1                       |
| H1H5764P                                                | 3,50E+05                              | 7,36E-03              | 2,10E-08                  | 2                       |
| H1H5769P                                                | 1,19E+05                              | 5,23E-04              | 4,41E-09                  | 22                      |
| H1H5771P                                                | 9,23E+05                              | 3,42E-04              | 3,71E-10                  | 34                      |
| H1H5772S                                                | 5,19E+05                              | 8,69E-04              | 1,67E-09                  | 13                      |
| H1H5777P                                                | 4,83E+05                              | 1,70E-03              | 3,52E-09                  | 7                       |
| H1H5778P                                                | 3,99E+05                              | 3,42E-05              | 8,56E-11                  | 338                     |
| H1H5780P                                                | 4,78E+05                              | 1,71E-04              | 3,58E-10                  | 68                      |
| H1H5781P                                                | 1,40E+05                              | 2,68E-04              | 1,92E-09                  | 43                      |
| H1H5782P                                                | ОС                                    | ОС                    | ОС                        | ОС                      |
| H1H5785B                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H5786B                                                | 3,00E+06                              | 4,24E-04              | 1,41E-10                  | 27                      |
| H1H5788P                                                | 7,06E+04                              | 1,64E-04              | 2,33E-09                  | 70                      |
| H1H5790B                                                | 9,25E+05                              | 2,36E-04              | 2,54E-10                  | 49                      |
| H1H5791B                                                | 7,86E+05                              | 3,40E-04              | 4,33E-10                  | 34                      |
| H1H5792B                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H5793B                                                | 4,78E+05                              | 1,59E-04              | 3,33E-10                  | 73                      |
| H1H5795B                                                | 1,58E+06                              | 2,29E-04              | 1,45E-10                  | 50                      |
| H1H5796B                                                | 1,05E+05                              | 2,44E-04              | 2,32E-09                  | 47                      |
| H1H5797B                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H5798B                                                | НИ                                    | НИ                    | НИ                        | НИ                      |
| H1H5799P                                                | 7,18E+05                              | 5,64E-03              | 7,85E-09                  | 2                       |
| H1H5801B                                                | 3,31E+05                              | 1,12E-03              | 3,38E-09                  | 10                      |
| ОКТ3                                                    | 3,94E+06                              | 2,18E-02              | 5,53E-09                  | 0,5                     |

Таблица 26. Аффинности связывания моновалентных 1-плечевых МАТ на приборе Вiasoge

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антитела |                           |                          |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| Антитело                                                | $k_a$ (Мс <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (с <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин.) |
| H1H7194P                                                | 1,16E+04                  | 1,51E-04                 | 1,30E-08         | 76               |
| H1H7195P                                                | 3,13E+04                  | 9,89E-05                 | 3,16E-09         | 117              |
| H1H7196P                                                | 1,07E+04                  | 4,43E-04                 | 4,13E-08         | 26               |
| H1H7198P                                                | 2,63E+04                  | 1,58E-04                 | 6,02E-09         | 73               |
| H1H7203P                                                | 1,46E+04                  | 2,67E-04                 | 1,83E-08         | 43               |
| H1H7204P                                                | 1,43E+04                  | 3,62E-04                 | 2,53E-08         | 32               |
| H1H7208P                                                | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H7211P                                                | 1,41E+04                  | 1,59E-04                 | 1,13E-08         | 73               |
| H1H7221P                                                | 1,07E+04                  | 2,92E-04                 | 2,75E-08         | 40               |
| H1H7223P                                                | 1,60E+04                  | 3,07E-04                 | 1,92E-08         | 38               |
| H1H7226P                                                | 1,30E+04                  | 3,55E-04                 | 2,72E-08         | 33               |
| H1H7232P                                                | 8,03E+03                  | 1,77E-03                 | 2,20E-07         | 7                |
| H1H7233P                                                | 1,11E+04                  | 2,69E-04                 | 2,42E-08         | 43               |
| H1H7241P                                                | 1,34E+04                  | 2,95E-04                 | 2,20E-08         | 39               |
| H1H7242P                                                | 2,15E+04                  | 6,64E-04                 | 3,09E-08         | 17               |
| H1H7250P                                                | 2,34E+04                  | 2,47E-04                 | 1,05E-08         | 47               |
| H1H7251P                                                | 2,56E+04                  | 1,07E-03                 | 4,17E-08         | 11               |
| H1H7254P                                                | 2,60E+04                  | 3,88E-04                 | 1,49E-08         | 30               |
| H1H7258P                                                | 1,26E+04                  | 3,02E-04                 | 2,40E-08         | 38               |
| H1H7269P                                                | 2,57E+04                  | 6,24E-03                 | 2,43E-07         | 2                |
| H1H7279P                                                | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1xH7221G                                               | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1xH7221G3                                              | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1xH7221G5                                              | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |

Таблица 27. Аффинности связывания моновалентных 1-плечевых МАТ на приборе Вiasoge

| Связывание при температуре 25°C/Формат захвата антигена |                           |                          |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| Антитело                                                | $k_a$ (Мс <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (с <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин.) |
| H1H7194P                                                | 3,50E+05                  | 8,43E-05                 | 2,41E-10         | 137              |
| H1H7195P                                                | 5,66E+05                  | 7,14E-05                 | 1,26E-10         | 162              |
| H1H7196P                                                | 1,85E+05                  | 4,61E-04                 | 2,49E-09         | 25               |
| H1H7198P                                                | 6,28E+05                  | 7,07E-05                 | 1,12E-10         | 163              |
| H1H7203P                                                | 4,79E+05                  | 2,38E-04                 | 4,98E-10         | 48               |
| H1H7204P                                                | 1,73E+05                  | 3,65E-04                 | 2,12E-09         | 32               |
| H1H7208P                                                | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1H7211P                                                | 3,45E+05                  | 9,61E-05                 | 2,79E-10         | 120              |
| H1H7221P                                                | 1,36E+05                  | 2,39E-04                 | 1,75E-09         | 48               |
| H1H7223P                                                | 1,87E+05                  | 2,86E-04                 | 1,53E-09         | 40               |
| H1H7226P                                                | 4,18E+05                  | 2,36E-04                 | 5,65E-10         | 49               |
| H1H7232P                                                | 1,49E+05                  | 1,49E-03                 | 1,00E-08         | 8                |
| H1H7233P                                                | 1,61E+05                  | 2,04E-04                 | 1,27E-09         | 57               |
| H1H7241P                                                | 1,87E+05                  | 2,36E-04                 | 1,26E-09         | 49               |
| H1H7242P                                                | 3,83E+05                  | 1,01E-03                 | 2,63E-09         | 11               |
| H1H7250P                                                | 2,31E+05                  | 1,89E-04                 | 8,20E-10         | 61               |
| H1H7251P                                                | 4,47E+05                  | 1,19E-03                 | 2,67E-09         | 10               |
| H1H7254P                                                | 4,33E+05                  | 3,30E-04                 | 7,62E-10         | 35               |
| H1H7258P                                                | 1,33E+05                  | 2,90E-04                 | 2,18E-09         | 40               |
| H1H7269P                                                | 2,77E+05                  | 6,89E-03                 | 2,49E-08         | 2                |
| H1H7279P                                                | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1xH7221G                                               | НИ                        | НИ                       | НИ               | НИ               |
| H1xH7221G3                                              | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |
| H1xH7221G5                                              | ОС                        | ОС                       | ОС               | ОС               |

Как показано в табл. 22-27, некоторые антитела против CD3 согласно настоящему изобретению связывались с CD3 в формате захвата антитела или захвата антигена с высокой аффинностью.

Пример 14. Антитела против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию.

Исследовали способность антител против CD3 согласно настоящему изобретению связываться с Т-клетками человека и вызывать их пролиферацию. Связывание оценивали с применением клеток Юркат (линия CD3+ Т-клеток человека), в то время как пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) оценивали с применением количественного определения, катализируемого АТФ (CellTiter Glo®). Антитело против CD3 ОКТ3 выступало в качестве положительного контроля, и нерелевантные изотипически сходные антитела выступали в качестве отрицательных контролей.

Данные FACS получали с применением следующего протокола: клетки в концентрации  $2 \times 10^5$  на лунку инкубировали с серийными разведениями антител в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали, добавляли вторичное антитело и инкубировали еще в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в холодном ФБР, содержащем 1% БСА, и анализировали методом проточной цитометрии; жизнеспособные клетки Юркат отбирали посредством бокового и прямого светорассеяния.  $EC_{50}$  для титрования связывания клеток определяли с применением программного обеспечения Prism со значениями, рассчитанными с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели.

Данные пролиферации получали с применением следующего протокола: МКПК человека ( $5 \times 10^4$ /лунку) инкубировали с 3-кратным серийным разведением антитела против CD3 и постоянной концентрацией коммерческого антитела против CD28 (200 нг/мл) в 96-луночных планшетах в течение 72 ч при температуре 37°C. После инкубации добавляли CellTiter Glo®, люминесценцию измеряли с применением многоканального считывающего устройства для планшетов VICTOR X5 (PerkinElmer).  $EC_{50}$  жизнеспособности клеток (количественное определение, катализируемое АТФ) рассчитывали с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели в GraphPad Prism.

Результаты экспериментов по связыванию и пролиферации обобщены в табл. 28-30.

Таблица 28. Гибридомные МАТ против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

| Антитело | $EC_{50}$ [М] FACS ЮРКАТ | $EC_{50}$ [М] пролиферации ЧМКПК |
|----------|--------------------------|----------------------------------|
| H2M2689N | OC                       | 0,00E+00                         |
| H2M2690N | 4,37E-09                 | 5,37E-12                         |
| H2M2691N | 6,77E-09                 | 3,43E-11                         |
| H1M2692N | 5,99E-09                 | 1,42E-10                         |
| H2M2704N | 8,45E-10                 | 2,93E-12                         |
| H2M2705N | 2,96E-10                 | 1,76E-11                         |
| H2M2706N | 2,37E-09                 | 3,86E-12                         |
| H2M2707N | 1,24E-07                 | 1,92E-12                         |
| H2M2708N | 6,58E-10                 | 2,69E-08                         |
| H2M2709N | 7,11E-10                 | 2,48E-11                         |
| H2M2710N | 7,10E-10                 | 2,11E-10                         |
| H2M2711N | 1,16E-09                 | 6,48E-10                         |
| H1M2712N | 2,19E-08                 | 1,28E-10                         |
| H2M2774N | 3,52E-10                 | 4,92E-10                         |
| H2M2775N | 1,32E-09                 | 1,09E-09                         |
| H2M2776N | 4,91E-10                 | 2,84E-11                         |
| H2M2777N | 2,16E-09                 | 2,51E-11                         |
| H2M2778N | 3,62E-09                 | 0,00E+00                         |
| H2M2779N | НИ                       | 0,00E+00                         |
| H2M2789N | НИ                       | 2,85E-08                         |
| H2M2862N | 7,68E-09                 | 6,72E-13                         |
| H2M2885N | 2,09E-09                 | 2,49E-12                         |
| H2M2886N | 3,97E-09                 | 2,69E-12                         |
| H2M3540N | 3,99E-09                 | 3,16E-12                         |
| H2M3541N | 3,70E-09                 | 6,40E-12                         |
| H1M3542N | 2,01E-09                 | 0,00E+00                         |
| H2M3543N | 5,63E-09                 | 6,12E-12                         |
| H1M3544N | 2,32E-08                 | 0,00E+00                         |

|                        |          |          |
|------------------------|----------|----------|
| H2M3547N               | 2,71E-09 | 5,02E-12 |
| H2M3548N               | 1,10E-09 | 1,89E-12 |
| H1M3549N               | 2,30E-09 | 0,00E+00 |
| H2M3563N               | 1,07E-09 | 7,74E-12 |
| H1M3613N               | 1,03E-08 | 0,00E+00 |
| Изотипический контроль | OC       | 0,00E+00 |

OC: отсутствие связывания; НИ: не исследовали

Таблица 29. МАТ Fc человека против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

| Антитело               | EC <sub>50</sub> [M] FACS ЮРКАТ | EC <sub>50</sub> [M] пролиферации чМПК |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| H1H5751P               | 2,12E-09                        | 9,29E-12                               |
| H1H5752P               | 3,43E-10                        | 1,09E-12                               |
| H1H5753B               | OC                              | 9,14E-11                               |
| H1H5755B               | 1,23E-09                        | 4,24E-12                               |
| H1H5756B               | OC                              | 0,00E+00                               |
| H1H5757B               | 3,38E-09                        | 4,86E-12                               |
| H1H5758B               | 1,90E-09                        | 2,13E-12                               |
| H1H5761P               | 2,10E-09                        | 3,62E-13                               |
| H1H5763P               | 2,76E-09                        | 3,11E-13                               |
| H1H5764P               | 8,80E-10                        | 3,27E-13                               |
| H1H5769P               | 4,10E-09                        | 6,17E-12                               |
| H1H5771P               | НИ                              | 6,35E-12                               |
| H1H5772S               | 6,64E-10                        | 4,42E-12                               |
| H1H5777P               | 5,71E-10                        | 3,04E-12                               |
| H1H5778P               | 6,85E-10                        | 5,04E-12                               |
| H1H5780P               | 7,62E-10                        | 3,44E-12                               |
| H1H5781P               | 1,23E-09                        | 6,08E-12                               |
| H1H5782P               | OC                              | 5,17E-12                               |
| H1H5785B               | OC                              | 0,00E+00                               |
| H1H5786B               | 1,10E-09                        | 1,79E-12                               |
| H1H5788P               | 3,53E-09                        | 4,62E-12                               |
| H1H5790B               | 3,55E-09                        | 2,71E-12                               |
| H1H5791B               | 3,77E-09                        | 1,75E-12                               |
| H1H5792B               | 5,87E-09                        | 6,47E-12                               |
| H1H5793B               | 4,62E-09                        | 3,28E-12                               |
| H1H5795B               | 2,04E-09                        | 3,09E-12                               |
| H1H5796B               | 9,82E-09                        | 4,37E-12                               |
| H1H5797B               | 3,96E-08                        | 1,07E-11                               |
| H1H5798B               | 5,57E-09                        | 2,59E-12                               |
| H1H5799P               | НИ                              | 1,63E-13                               |
| H1H5801B               | 1,55E-08                        | 1,09E-12                               |
| ОКТ3                   | 1,96E-10                        | 3,30E-13                               |
| Изотипический контроль | OC                              | 0,00E+00                               |

OC: отсутствие связывания; НИ: не исследовали

Таблица 30. Моновалентные 1-плечевые МАТ против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

| Антитело               | EC <sub>50</sub> [М] FACS ЮРКАТ | EC <sub>50</sub> [М] пролиферации чМКПК |
|------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| H1H7194P               | 1,50E-09                        | 2,37E-12                                |
| H1H7195P               | 3,42E-10                        | 2,42E-12                                |
| H1H7196P               | 3,44E-08                        | 1,27E-12                                |
| H1H7198P               | 7,26E-10                        | 2,55E-12                                |
| H1H7203P               | 3,24E-09                        | 1,64E-12                                |
| H1H7204P               | 2,29E-09                        | 1,51E-12                                |
| H1H7208P               | 5,19E-08                        | 1,46E-12                                |
| H1H7211P               | 7,01E-10                        | 2,75E-12                                |
| H1H7221P               | 1,40E-09                        | 2,60E-12                                |
| H1H7223P               | 9,37E-10                        | 1,07E-12                                |
| H1H7226P               | 7,95E-10                        | 9,52E-13                                |
| H1H7232P               | 1,50E-09                        | 1,03E-12                                |
| H1H7233P               | 7,15E-10                        | 7,34E-13                                |
| H1H7241P               | 1,01E-09                        | 1,05E-12                                |
| H1H7242P               | 1,83E-09                        | 2,13E-12                                |
| H1H7250P               | 1,37E-09                        | 2,43E-12                                |
| H1H7251P               | 1,45E-09                        | 1,30E-12                                |
| H1H7254P               | 1,09E-09                        | 2,80E-12                                |
| H1H7258P               | 1,07E-09                        | 2,17E-12                                |
| H1H7269P               | 1,95E-09                        | 1,15E-12                                |
| H1H7279P               | OC                              | 0,00E+00                                |
| Изотипический контроль | OC                              | 0,00E+00                                |

OC: отсутствие связывания; НИ: не исследовали

Как показано в табл. 7-9, подавляющее большинство антител против CD3 согласно настоящему изобретению связывались с Т-клетками человека и индуцировали пролиферацию Т-клеток.

Пример 15. Антитела против CD3 связываются с Т-клетками обезьяны и вызывают их пролиферацию.

Исследовали способность подпопуляции антител против CD3 согласно настоящему изобретению связываться с Т-клетками обезьяны и вызывать их пролиферацию.

Данные FACS получали с применением следующего протокола: клетки в концентрации  $2 \times 10^5$  на лунку инкубировали с серийными разведениями антител в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали, добавляли вторичные антитела и инкубировали еще в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в холодном ФБР, содержащем 1% БСА, и анализировали методом проточной цитометрии. CD4<sup>+</sup> Т-клетки обезьяны отбирали посредством бокового и прямого светорассеяния и в популяции CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>. EC<sub>50</sub> для титрования связывания клеток рассчитывали с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели в GraphPad Prism.

Данные пролиферации получали с применением следующего протокола: свежeweделенные МКПК, полученные из яванского макака ( $5 \times 10^4$ /лунку), инкубировали с 3-кратным серийным разведением антитела против CD3 и постоянной концентрацией коммерческого антитела против CD28 (500 нг/мл) в 96-луночных планшетах в течение 72 ч при температуре 37°C. После инкубации добавляли CellTiter Glo® и измеряли люминесценцию с применением многоканального считывающего устройства для планшетов VICTOR X5 (PerkinElmer). EC<sub>50</sub> жизнеспособности клеток (количественное определение, катализируемое АТФ) рассчитывали с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели в GraphPad Prism.

Результаты экспериментов по связыванию и пролиферации обобщены в табл. 31 и 32.

Таблица 31. МАТ против CD3 связываются с МКПК обезьяны и вызывают их пролиферацию

| Антитело | ЕС50 [М] FACS МКПК | ЕС50 [М] пролиферации МКПК обезьяны |
|----------|--------------------|-------------------------------------|
| H1H2690N | 5,66E-09           | 2,71E-12                            |
| H1H2712N | 2,29E-09           | 2,72E-12                            |
| H2M3547N | 1,12E-10           | НИ                                  |
| H2M3563N | 1,65E-10           | НИ                                  |
| H1H5761P | НИ                 | 2,81E-09                            |
| H1H5763P | НИ                 | 0,00E+00                            |
| H1H5764P | НИ                 | 4,06E-10                            |
| H1H5769P | НИ                 | 8,33E-13                            |
| H1H5771P | НИ                 | 2,74E-12                            |
| H1H5772S | НИ                 | 1,47E-12                            |
| H1H5778P | НИ                 | 5,93E-13                            |
| H1H5780P | НИ                 | 3,13E-13                            |
| H1H5781P | НИ                 | 7,92E-13                            |
| H1H5788P | НИ                 | 2,01E-12                            |
| ОКТ3     | ОС                 | НИ                                  |
| SP34     | 7,03E-11           | 1,71E-12                            |

ОС: отсутствие связывания; НИ: не исследовали

Таблица 32. Моновалентные 1-плечевые МАТ против CD3 связываются с МКПК обезьяны и вызывают их пролиферацию

| Антитело | ЕС50 [М] FACS МКПК | ЕС50 [М] пролиферации МКПК обезьяны |
|----------|--------------------|-------------------------------------|
| H1H7194P | НИ                 | 4,84E-12                            |
| H1H7195P | НИ                 | 1,36E-12                            |
| H1H7196P | НИ                 | 1,40E-08                            |
| H1H7198P | НИ                 | 2,29E-12                            |
| H1H7203P | НИ                 | 4,97E-13                            |
| H1H7204P | НИ                 | 1,26E-11                            |
| H1H7208P | НИ                 | 7,02E-12                            |
| H1H7211P | НИ                 | 2,81E-13                            |
| H1H7221P | НИ                 | 1,72E-12                            |
| H1H7223P | НИ                 | 6,75E-11                            |
| H1H7226P | НИ                 | 2,26E-11                            |
| H1H7232P | НИ                 | 4,90E-11                            |
| H1H7233P | НИ                 | 4,35E-12                            |
| H1H7241P | НИ                 | 2,05E-11                            |
| H1H7242P | НИ                 | 1,38E-11                            |
| H1H7250P | НИ                 | 7,27E-11                            |
| H1H7251P | НИ                 | 1,83E-11                            |
| H1H7254P | НИ                 | 8,88E-11                            |
| H1H7258P | НИ                 | 1,11E-11                            |

ОС: отсутствие связывания; НИ: не исследовали

Как показано в табл. 31 и 32, некоторые антитела против CD3 согласно настоящему изобретению связывались с Т-клетками CD2+CD4+ обезьяны и вызывали их пролиферацию. ОКТ3 не запускали пролиферацию МКПК обезьяны, в то время как SP34 являлись активными против МКПК обезьяны.

Пример 16. МАТ против CD3 поддерживают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток.

Способность антител против CD3 перенаправлять опосредованное Т-клетками уничтожение посредством взаимодействий Fc/FcR исследовали с применением анализа уничтожения U937 на основе кальцеина. Вкратце, МКПК человека выделяли с помощью фиколл-пака и активировали в течение нескольких дней средой, содержащей ИЛ-2 человека (30 Ед./мл) и бусины для активации Т-клеток (против CD3/CD28). Клетки U937 метили кальцеином, а затем инкубировали с активированными Т-клетками при соотношении эффекторных клеток:клеток-мишеней 10:1, с применением 3-кратных серийных разведений антител в течение 3 ч при температуре 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали и супернатанты переносили в прозрачные черные планшеты с прозрачным дном для флуоресцентного анали-

за. Значения  $EC_{50}$ , определенные в виде молярной концентрации антитела CD3, которая вызывает 50% цитотоксичности, рассчитывали с применением 4-параметровой нелинейной регрессионной модели в GraphPad Prism. Результаты с применением гибридных антител, антител Fc человека и моновалентных одноплечевых антител показаны в табл. 33, 34 и 35 соответственно.

Таблица 33. Гибридные МАТ против CD3 перенаправляли опосредованное Т-клетками уничтожение на клетки U937

| Антитело               | Цитотоксичность Т-клеток человека в отношении U937 [M] |
|------------------------|--------------------------------------------------------|
| H2M2689N               | 0,00E+00                                               |
| H2M2690N               | 2,79E-11                                               |
| H2M2691N               | 2,34E-11                                               |
| H1M2692N               | 3,59E-10                                               |
| H2M2704N               | 2,49E-12                                               |
| H2M2705N               | 1,73E-12                                               |
| H2M2706N               | 7,91E-12                                               |
| H2M2707N               | 7,21E-12                                               |
| H2M2708N               | 3,27E-12                                               |
| H2M2709N               | 3,47E-12                                               |
| H2M2710N               | 3,97E-12                                               |
| H2M2711N               | 3,66E-12                                               |
| H1M2712N               | 3,14E-10                                               |
| H2M2774N               | 2,46E-12                                               |
| H2M2775N               | 3,38E-12                                               |
| H2M2776N               | 4,06E-12                                               |
| H2M2777N               | 4,86E-12                                               |
| H2M2778N               | 0,00E+00                                               |
| H2M2779N               | 6,75E-10                                               |
| H2M2789N               | НИ                                                     |
| H2M2862N               | 7,66E-12                                               |
| H2M2885N               | 3,71E-12                                               |
| H2M2886N               | 8,06E-12                                               |
| H2M3540N               | 1,25E-11                                               |
| H2M3541N               | 5,39E-11                                               |
| H1M3542N               | 2,92E-11                                               |
| H2M3543N               | 1,31E-11                                               |
| H1M3544N               | 1,72E-10                                               |
| H2M3547N               | 3,17E-11                                               |
| H2M3548N               | 5,50E-12                                               |
| H1M3549N               | 1,07E-10                                               |
| H2M3563N               | 4,05E-11                                               |
| H1M3613N               | 8,66E-10                                               |
| Изотипический контроль | 0,00E+00                                               |

НИ: не исследовали

Таблица 34. МАТ в формате Fc человека против CD3 перенаправляли опосредованное  
Т-клетками уничтожение на клетки U937

| Антитело               | Цитотоксичность Т-клеток человека в отношении U937 [M] |
|------------------------|--------------------------------------------------------|
| H1H5751P               | 1,30E-10                                               |
| H1H5752P               | 1,85E-11                                               |
| H1H5753B               | 3,79E-10                                               |
| H1H5755B               | 5,16E-11                                               |
| H1H5756B               | 7,69E-11                                               |
| H1H5757B               | 9,65E-11                                               |
| H1H5758B               | 8,86E-08                                               |
| H1H5761P               | 2,00E-12                                               |
| H1H5763P               | НИ                                                     |
| H1H5764P               | НИ                                                     |
| H1H5769P               | 5,65E-11                                               |
| H1H5771P               | НИ                                                     |
| H1H5772S               | 6,89E-13                                               |
| H1H5777P               | 4,87E-13                                               |
| H1H5778P               | 3,41E-13                                               |
| H1H5780P               | 4,03E-12                                               |
| H1H5781P               | 1,83E-12                                               |
| H1H5782P               | 5,18E-12                                               |
| H1H5785B               | 4,43E-11                                               |
| H1H5786B               | 6,10E-11                                               |
| H1H5788P               | 1,54E-11                                               |
| H1H5790B               | 8,71E-11                                               |
| H1H5791B               | 8,01E-11                                               |
| H1H5792B               | 1,40E-10                                               |
| H1H5793B               | 8,85E-11                                               |
| H1H5795B               | 6,74E-11                                               |
| H1H5796B               | 5,03E-10                                               |
| H1H5797B               | 5,76E-10                                               |
| H1H5798B               | 1,81E-10                                               |
| H1H5799P               | НИ                                                     |
| H1H5801B               | 9,23E-11                                               |
| ОКТ3                   | 2,35E-12                                               |
| Изотипический контроль | 0,00E+00                                               |

НИ: не исследовали

Таблица 35. Моновалентные 1-плечевые МАТ против CD3 перенаправляли опосредованное Т-клетками уничтожение на клетки U937

| Антитело               | Цитотоксичность Т-клеток человека в отношении U937 [М] |
|------------------------|--------------------------------------------------------|
| H1H7194P               | 4,71E-12                                               |
| H1H7195P               | 6,10E-12                                               |
| H1H7196P               | 1,96E-11                                               |
| H1H7198P               | 5,21E-12                                               |
| H1H7203P               | 5,47E-12                                               |
| H1H7204P               | 1,08E-11                                               |
| H1H7208P               | 4,59E-11                                               |
| H1H7211P               | 7,89E-12                                               |
| H1H7221P               | 9,21E-12                                               |
| H1H7223P               | 5,30E-12                                               |
| H1H7226P               | 1,04E-11                                               |
| H1H7232P               | 9,96E-12                                               |
| H1H7233P               | 1,19E-11                                               |
| H1H7241P               | 1,23E-11                                               |
| H1H7242P               | 7,50E-12                                               |
| H1H7250P               | 5,91E-12                                               |
| H1H7251P               | 1,81E-12                                               |
| H1H7254P               | 4,18E-12                                               |
| H1H7258P               | 1,53E-11                                               |
| H1H7269P               | 1,08E-11                                               |
| H1H7279P               | 0,00E+00                                               |
| Изотипический контроль | 0,00E+00                                               |

НИ: не исследовали

Как показано в табл. 33-35, в данной системе анализа большинство антител против CD3, а также ОКТЗ поддерживали перенаправленное опосредованное Т-клетками уничтожение. Наблюдаемое уничтожение, которое, как полагают, зависело от ангажирования Fc антитела Fc-рецептором на клетках U937, что приводило к кластеризации CD3 на прилежащих Т-клетках, подавлялось в результате добавления неспецифичных IgG человека (данные не показаны).

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Фактически на основании представленного выше описания специалисту в данной области техники будут очевидны различные модификации изобретения дополнительно к таковым, описанным в настоящем документе. Подразумевается, что такие модификации относятся к объему прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с PSMA человека,

где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1514 или SEQ ID NO: 1618, и определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1386, и

где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с PSMA человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A3-HCDR3 переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 66, и определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1386.

2. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1516, 1518 и 1520 соответственно.

3. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1620, 1622 и 1624 соответственно.

4. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-3, где A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70 и 72 соответственно.

5. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-4, где LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1388, 1390 и 1392 соответственно.

6. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-5, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1514 или SEQ ID NO: 1618 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1386, и где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с PSMA человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1386.

7. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.6, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1514.

8. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.6, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, содержит HCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1618.

9. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-8, где:

(i) второй антигенсвязывающий домен связывается с клетками, экспрессирующими PSMA человека, и клетками яванского макака, экспрессирующими PSMA;

(ii) антигенсвязывающая молекула ингибирует рост опухоли у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека;

(iii) антигенсвязывающая молекула ингибирует рост опухоли у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека;

(iv) антигенсвязывающая молекула подавляет рост развившейся опухоли у мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; или

(v) антигенсвязывающая молекула снижает рост развившейся опухоли у мышей без иммунодефицита, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека.

10. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-9, где:

(i) антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток со значением  $EC_{50}$  менее приблизительно 1,3 нМ, как измерено в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*; и/или

(ii) второй антигенсвязывающий домен специфично связывается с PSMA человека со значением  $K_D$  менее приблизительно 80 нМ, как измерено в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса *in vitro*; и/или

(iii) где второй антигенсвязывающий домен специфично связывается с каждым PSMA человека со значением  $K_D$  менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 800 пМ или менее приблизительно 600 пМ, как измерено в анализе связывания методом поверхностного плазмонного резонанса *in vitro*.

11. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-10, которая представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

12. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака и рака желудка.

14. Фармацевтическая композиция по п.12, где раком является рак предстательной железы.

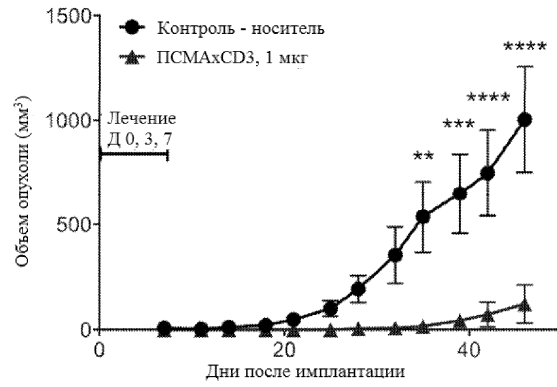
15. Фармацевтическая композиция по п.14, где рак предстательной железы является кастратрезистентным раком предстательной железы.

16. Способ лечения рака у индивида, где способ включает введение индивиду биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-11.

17. Способ по п.16, где рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака и рака желудка.

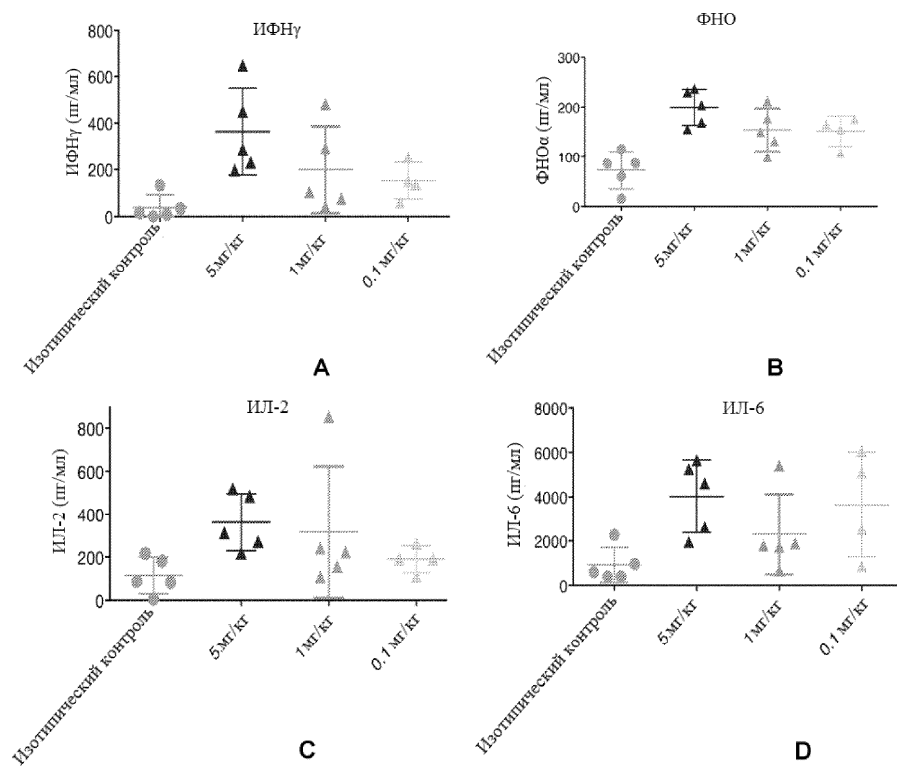
18. Способ по п.17, где рак представляет собой рак предстательной железы.

19. Способ по п.18, где рак предстательной железы является кастратрезистентным раком предстательной железы.



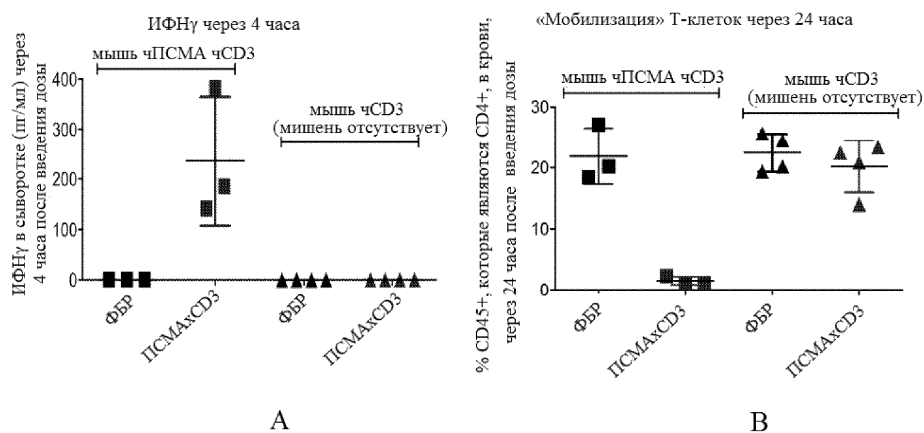
Фиг. 1

Лечение биспецифичным антителом против PCMA и CD3 вызывает временное дозозависимое повышение уровня циркулирующих цитокинов



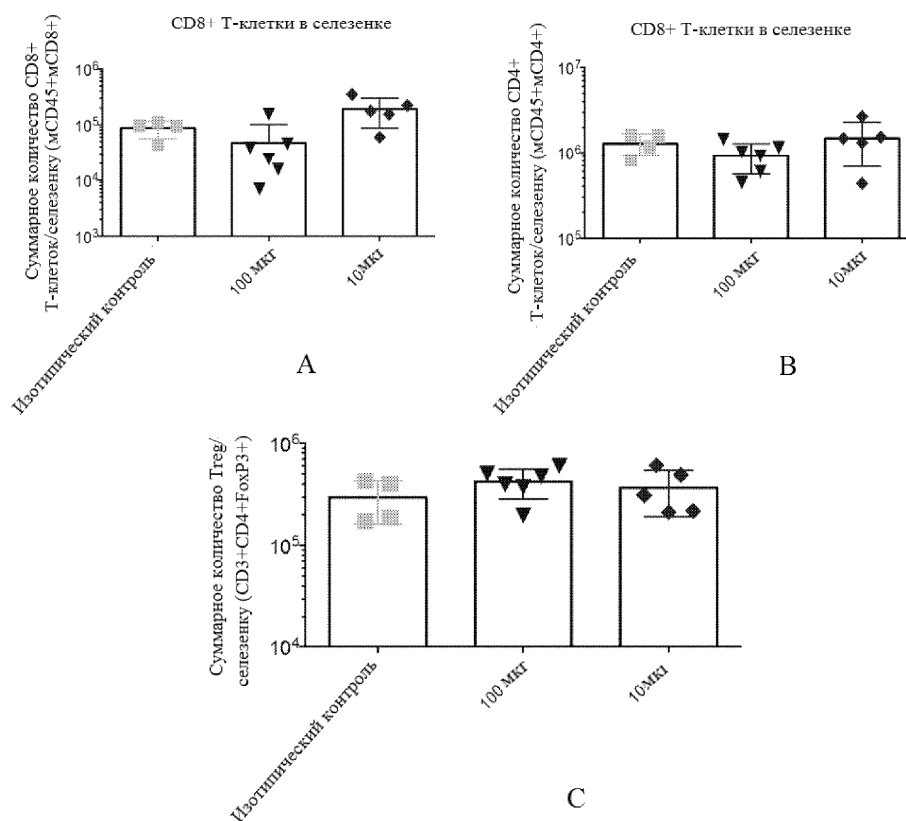
Фиг. 2

На гуманизированных мышах воспроизводятся изменения цитокинов  
и Т-клеток



Фиг. 3

Биспецифичные антитела против ПСМА и CD3 не истощают эффекторные Т-клетки в селезенке мыши без иммунодефицита



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2