

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092435** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.26

(22) Дата подачи заявки
2016.08.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВСМА**

(31) 15179549.9

(32) 2015.08.03

(33) EP

(62) 201890441; 2016.08.03

(71) Заявитель:
ЭНГМАБ САРЛ (CH)

(72) Изобретатель:

Бу Минх Диём (CH), Стрейн Клаус
(DE), Аст Оливер, Бакак Марина,
Делон Камий, Дуернер Лидия
Жасмин, Фраймозер-Грундшобер
Энн, Кляйн Кристиан, Моесснер
Эккехард, Мозер Самюэль, Умана
Пабло, Вайнзиерл Тина (CH)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М. (RU)

(57) Изобретение относится к новым антителам против ВСМА, их производству и применению.

202092435

A2

A2

202092435

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВСМА

Данное изобретение относится к новым антителам против ВСМА, их производству и применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антиген созревания В-клеток человека, также известный как ВСМА; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), представляет собой представителя суперсемейства рецепторов некроза опухолей, который преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках (Laabi et al. 1992; Madry et al. 1998). ВСМА является негликозилированным трансмембранным белком III типа, который вовлечен в созревание, рост и выживание В-клеток. ВСМА представляет собой рецептор для двух лигандов суперсемейства TNF: APRIL (индуцирующий пролиферацию лиганд), лиганд с высокой аффинностью к ВСМА, и фактор активации В-клеток BAFF, лиганд с низкой аффинностью к ВСМА (THANK, BlyS, стимулятор В-лимфоцитов, TALL-1 и zTNF4). Для APRIL и BAFF показано структурное сходство и перекрывание по все же различной специфичности рецепторного связывания. Негативный регулятор TACI также связывается как с BAFF, так и с APRIL. Координированное связывание APRIL и BAFF с ВСМА и/или TACI активирует фактор транскрипции NF-κB и увеличивает экспрессию представителей семейства Bcl-2 способствующих выживанию (например, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) и понижает регуляцию про-апоптических факторов (например, Bid, Bad, Bik, Bim и т. п.), тем самым ингибируя апоптоз и способствуя выживанию. Это комбинированное действие стимулирует дифференцировку, пролиферацию, выживаемость и продукцию антител В-клетками (как описано в обзоре Rickert RC et al., *Immunol Rev* (2011) 244 (1): 115-133).

Антитела против ВСМА описаны, например, в Gras M-P. et al. *Int Immunol.* 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, WO200124812, WO2010104949 и WO2012163805. Антитела против ВСМА и их применение для лечения лимфом и множественной миеломы упоминаются, например, в WO2002066516 и WO2010104949. WO2013154760 и WO2015052538 относятся к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим фрагмент распознавания ВСМА и фрагмент активации Т-клеток. Ryan, MC et al., *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 3009-3018 относится к анти-ВСМА антителам с блокирующей лиганды активностью, которая может стимулировать цитотоксичность для линий клеток множественной миеломы (ММ), таким как голые антитела или как конъюгаты антитело-лекарственное средство. Ryan показал, что SG1, ингибирующее ВСМА антитело, блокирует APRIL-зависимую активацию фактора-κB ядер дозозависимым способом *in vitro*. Ryan также упомянул, что антитело SG2, которое ингибировало APRIL, не значительно связывалось с ВСМА.

В недавнем прошлом было разработано большое разнообразие форм рекомбинантных биспецифических антител, например, путем слияния, к примеру формы антитела-IgG и

одноцепочечных доменов (см., например, Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16). Биспецифические антитела, в которых переменные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменяют друг друга, описаны в WO2009080251 и WO2009080252.

Подход для преодоления проблемы неправильно спаренных побочных продуктов, которая известна как принцип «выступы-в-углубления», помогает при принудительном спаривании двух тяжелых цепей различных антител путем введения мутаций в домены CH3 с целью модификации контактной поверхности. Для получения «углубления» на одной цепи объемные аминокислоты заменяли аминокислотами с короткими боковыми цепями. И наоборот, для получения «выступа» в другой домен CH3 вводили аминокислоты с большими боковыми цепями. Совместной экспрессией этих двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, которые должны соответствовать обеим тяжелым цепям), наблюдали высокие выходы образования гетеродимеров (выступ-углубление) по сравнению с образованием гомодимеров (выступ-выступ или углубление-углубление) (Ridgway JB, Presta LG, Carter P. Protein Eng. 9, 617–621 (1996) и WO1996027011). Процентное содержание гетеродимера возможно дополнительно увеличивать перестройкой поверхностей взаимодействия двух доменов CH3 с использованием подхода фагового дисплея и введения дисульфидного мостика для стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol. Biol 270 (1997) 26-35). Новые подходы для технологии «выступы-в-углубления» описаны, например, в EP 1870459A1. Хотя этот формат кажется очень привлекательным, данные, описывающие продвижение в вопросе клинического применения, в настоящее время недоступны. Одно важное ограничение этой стратегии заключается в том, что легкие цепи двух исходных антител должны быть идентичными для предотвращения неправильного спаривания и образования неактивных молекул. Таким образом данная методика не подходит для простой разработки рекомбинантных биспецифических антител против двух мишеней, начиная с двух антител против первой и второй мишени, поскольку любая их тяжелых цепей этих антител и/или идентичные легкие цепи должны быть оптимизированы. В Xie, Z., et al, J Immunol. Methods 286 (2005) 95-101 предложена форма биспецифического антитела, использующая scFv в комбинации с технологией «выступы-в-углубления» для части FC.

Комплекс TCR/CD3 Т-лимфоцитов состоит либо из гетеродимера TCR альфа (α)/бета (β), либо TCR гамма (γ)/дельта (δ), который совместно экспрессируется на поверхности клеток с эквивалентными субъединицами CD3-меченого гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), дзета (ζ) и эта (η). CD3 ϵ человека описан под кодом UniProt P07766 (CD3E_HUMAN).

Анти-CD3 ϵ антитело описано в данном состоянии техники как SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 реагирует как с CD3 приматов, так и человека. SP34 доступен в компании

Pharmingен. Дополнительно анти-CD3 антитело описано в данном состоянии техники как UCNT-1 (см. WO2000041474). Дополнительно анти-CD3 антитело описано в данном состоянии техники как BC-3 (Институт исследования рака Фреда Хатчинсона; использовано в клинических исследованиях GvHD фазы I/II, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 отличается от UCNT-1 и BC-3 в том, что SP-34 распознает эпитоп, представленный целиком на ϵ -цепи CD3 (см. Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047), тогда как UCNT-1 и BC-3 распознают эпитоп, размещенный на обеих ϵ - и γ -цепях. Дополнительно анти-CD3 антитела описаны в WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837, WO2010037838 и US8236308 (WO2007042261). Последовательности CDR, VH и VL дополнительного анти-CD3 антитела показаны на SEQ ID NO:7 и 8.

Биспецифические антитела против CD3 и BCMA упомянуты в WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058 и WO2012143498. CAR-соединения антител против BCMA упомянуты в WO2013154760, WO2013154760 и WO2014140248.

Опосредованные клетками эффекторные функции моноклональных антител (как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)) можно усиливать путем конструирования их олигосахаридной композиции на Asn297, как описано в Umaña, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 и US6602684. WO1999054342, WO2004065540, WO2007031875, and WO2007039818, Hristodorov D, Fischer R, Linden L., Mol Biotechnol. 2012 Oct 25. (Epub) также относится к конструированию гликозилирования антител для улучшения Fc-опосредованной клеточной цитотоксичности.

Несколько аминокислотных остатков в шарнирном участке и домене CH2 также влияют на опосредованные клетками функции моноклональных антител (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]. Поэтому модификации таких аминокислот могут усиливать опосредованные клетками функции. Такие модификации антител для увеличения опосредованных клетками эффекторных функций упомянуты в EP1931709, WO200042072 и заключаются в заменах Fc-части в аминокислотном (-ых) положении (-ях) 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 и 332. Дополнительные модификации антител для увеличения опосредованных клетками эффекторных функций упомянуты в EP1697415 и заключаются в аминокислотной замене положений аминокислот EU 277, 289, 306, 344 или 378 заряженной аминокислотой, полярной аминокислотой или неполярной аминокислотой.

Формы антител и формы биспецифических и мультиспецифических антител также представляют собой пептела (WO200244215), новые рецепторы антигенов (NAR) (WO2003014161), димеры диатело-диатело «TandAb» (WO2003048209), модифицированный полиалкиленоксидами scFv (US7150872), гуманизированные антитела кролика (WO2005016950), синтетические иммуноглобулиновые домены

(WO2006072620), ковалентные диатела (WO2006113665), флекситела (WO2003025018), доменные антитела, dAb (WO2004058822), вакцитело (WO2004076489), антитела с каркасом приматов Нового Света (WO2007019620), конъюгаты антитело-лекарственное средство с расщепляемым линкером (WO2009117531), антитела-IgG4 с удаленным шарнирным участком (WO2010063785), биспецифические антитела с IgG4-подобными доменами CH3 (WO2008119353), верблюжьих антитела (US6838254), нанотела (US7655759), диатела CAT (US5837242), биспецифические (scFv)₂, направленные против антигена-мишени и CD3 (US7235641), sIgA pl-антитела (US6303341), минитела (US5837821), IgNAR (US2009148438), антитела с модифицированным шарниром и Fc-участком (US2008227958, US20080181890), трифункциональные антитела (US5273743), triomab (US6551592), тройтела (US6294654).

В WO2014122143 описаны антитела против BCMA человека, характеризующиеся тем, что связывание указанного антитела не снижается в присутствии 100 нг/мл APRIL на более 20 %, при измерении в анализе ELISA как ОП при 405 нм, по сравнению со связыванием указанного антитела с BCMA человека без APRIL, указанное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB на более 20 % по сравнению с одним APRIL и указанное антитело не изменяет активацию NF-κB без APRIL на более 20 % по сравнению с анализом без указанного антитела. В WO2014122144 описаны биспецифические антитела, специфически связывающиеся с двумя мишенями CD3ε человека и BCMA человека, включая антитела против BCMA человека по WO2014122143. Антитело против BCMA человека с уникальными свойствами, особенно в отношении его терапевтического применения как биспецифического связывающего Т-клетки антитела, представляет собой антитело 83A10, характеризующееся наличием CDR-участков CDR1H с SEQ ID NO:15, CDR2H с SEQ ID NO:16, CDR3H с SEQ ID NO:17, CDR1L с SEQ ID NO:18, CDR3L с SEQ ID NO:19 и CDR3L с SEQ ID NO:20, описанное также в WO2014122143 и WO2014122144.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение содержит моноклональные антитела специфически связывающиеся с антигеном созревания В-клеток человека (BCMA). Антитела в соответствии с данным изобретением содержат такие же CDR3H- и CDR3L-участки, как и CDR-участки антитела 83A10.

Антитела в соответствии с данным изобретением в одном варианте реализации изобретения содержат такие же CDR3H- и CDR3L-участки, как и CDR-участки антитела 83A10, но показывают преимущества с особенной активностью и эффективностью по сравнению с антителом 83A10 в отношении уничтожения клеток MM в аспиратах костного мозга пациентов.

В изобретении представлено моноклональное антитело специфически связывающееся с ВСМА, характеризующееся наличием CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

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

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

г) CDR1H-участка с SEQ ID NO:29 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:30, CDR1L-участка с SEQ ID NO:31 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:32,

д) CDR1H-участка с SEQ ID NO:34 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:35, CDR1L-участка с SEQ ID NO:31 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:32, и

е) CDR1H-участка с SEQ ID NO:36 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:37, CDR1L-участка с SEQ ID NO:31 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:32.

В изобретении представлено моноклональное антитело специфически связывающееся с ВСМА, характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR1H-участок с SEQ ID NO:21, CDR2H-участок с SEQ ID NO:22 и CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

а) CDR1L-участка с SEQ ID NO:23 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:24,

б) CDR1L-участка с SEQ ID NO:25 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:26, или

в) CDR1L-участка с SEQ ID NO:27 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:28.

В изобретении предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка, выбранного из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14, в которых аминокислота 49 выбрана из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 49 представляет собой E в SEQ ID NO:12, S в SEQ ID NO:13 или H в SEQ ID NO:14.

В изобретении предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка, выбранного из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14, в

которых аминокислота 74 представляет собой треонин (Т) или аланин (А). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 74 представляет собой А в SEQ ID NO:14.

Антитела в соответствии с данным изобретением содержатся в варианте реализации изобретения, как CDR3H-, CDR1L-, CDR2L- и CDR3L-участки, такие же как CDR-участки антитела 83A10. В изобретении представлено моноклональное антитело, специфически связывающееся с ВСМА, характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR1L-участок с SEQ ID NO:31, CDR2L-участок с SEQ ID NO:32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка с SEQ ID NO:12 и VH-участка, выбранного из группы, содержащей VH-участки с SEQ ID NO:38, 39 и 40. В изобретении предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка с SEQ ID NO:12, в котором аминокислота 49 выбрана из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 49 представляет собой E.

В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VL-участка, VL-участка, выбранного из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:13. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:14.

В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:38, 39 и 40. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:38, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:39, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:40, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с данным изобретением дополнительно характеризуется тем, что оно специфически связывается также с ВСМА яванского макака. В одном варианте реализации изобретения антитело по данному изобретению показывает соответствующее связывание с ВСМА яванского макака/человека с диапазоном аффинности от 1,5 до 5 или от 1,5 до 10, или от 1,5 до 16 (табл. 5).

Поэтому биспецифическое антитело в соответствии с изобретением, в одном варианте реализации характеризуется тем, что оно специфически связывается также с CD3 яванского макака. В одном варианте реализации изобретения биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 антитело по данному изобретению показывает диапазон аффинности Mab CD3 яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0.

В дополнительном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением представляет собой антитело с Fc-частью или без Fc-части, включая мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), такой как привлекающий T-клетки биспецифический активатор, диатело или tandemный scFv, антитело-миметик, такое как DARPin, голое моноспецифическое антитело или конъюгат антитела-лекарственного средства. В одном варианте реализации изобретения мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, привлекающий T-клетки биспецифический активатор, диатело или tandemный scFv специфически связываются с ВСМА и CD3.

На основе антитела, в соответствии с изобретением, существует возможность создавать конъюгаты антитело-лекарственное средство против ВСМА и мультиспецифические или биспецифические антитела против ВСМА и одной или более дополнительных мишеней в различных формах с или без Fc-части, известных в данном состоянии техники (см. к примеру «уровень техники данного изобретения»

выше), одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), такие как привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы, диатела, тандемные scFvs и антитела-миметики, такие как DARPin, все из которых также представляют собой варианты по данному изобретению. Формы биспецифических антител хорошо известны в данном состоянии техники и, например, описаны в Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126- 1136 и Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) и Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлено биспецифическое антитело против двух мишеней CD3ε человека (дополнительно также называемый CD3) и внеклеточного домена ВСМА (дополнительно также называемый ВСМА), характеризующееся наличием ВСМА-связывающей части анти-ВСМА антитела в соответствии с изобретением.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому антителу против ВСМА и CD3, характеризующееся наличием в ВСМА-связывающей части CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому антителу против ВСМА и CD3, характеризующемуся наличием VH-участка, в соответствии с изобретением (дополнительно называемого ВСМА VH), содержащего CDR1H-участок с SEQ ID NO:21, CDR2H-

участок с SEQ ID NO:22 и CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка (дополнительно называемого BCMA VL), содержащего CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

- a) CDR1L-участка с SEQ ID NO:23 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:24,
- b) CDR1L-участка с SEQ ID NO:25 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:26 или
- c) CDR1L-участка с SEQ ID NO:27 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:28.

В изобретении, в одном варианте реализации, предложено биспецифическое антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VH-участка BCMA VH с SEQ ID NO:10.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому антителу против BCMA и CD3, характеризующемуся тем, что VL BCMA выбран из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве участка VH BCMA, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH BCMA, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:13. В изобретении, в одном варианте реализации, предложено антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием в качестве VH BCMA, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:14.

В изобретении предложено биспецифическое антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка, выбранного из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14, в которых аминокислота 49 выбрана из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 49 представляет собой E (SEQ ID NO:12), S (SEQ ID NO:13) или H (SEQ ID NO:14). В изобретении предложено биспецифическое антитело в соответствии с данным изобретением, характеризующееся наличием VL-участка, выбранного из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14, в которых аминокислота 74 представляет собой треонин (T) или аланин (A). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 74 представляет собой A в SEQ ID NO:14.

Данное изобретение относится к биспецифическому антителу против BCMA и CD3, характеризующемуся наличием BCMA VH, содержащего CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и BCMA VL, содержащего CDR1L-участок с SEQ ID NO:31, CDR2L-участок с SEQ ID NO:32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

a) CDR1H-участка с SEQ ID NO:29 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:30,

b) CDR1H-участка с SEQ ID NO:34 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:35, или

c) CDR1H-участка с SEQ ID NO:36 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:37.

Для биспецифического антитела против BCMA и CD3, в одном варианте реализации изобретения, характерно наличие анти-BCMA антитела в соответствии с изобретением и анти-CD3 антитела в соответствии с изобретением, в которых

- a) легкая цепь и тяжелая цепь антитела специфически связывается с одной из указанных мишеней CD3 и BCMA; и
- b) легкая цепь и тяжелая цепь антитела специфически связывается с другой из указанных мишеней, при этом переменные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменяют друг друга.

В одном варианте реализации изобретения VH-домен указанной части анти-CD3 антитела связан с CH1- или CL-доменом указанной части анти-BCMA антитела. В одном варианте реализации изобретения VL-домен указанной части анти-CD3 антитела связан с CH1- или CL-доменом указанной части анти-BCMA антитела.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит не более одного Fab-фрагмента части анти-CD3 антитела, не более двух Fab-фрагментов части анти-BCMA антитела и не более одной Fc-части в одном варианте реализации Fc-части человека. В одном варианте реализации изобретения не более одного Fab-фрагмента части анти-CD3 антитела и не более одного Fab-фрагмента части анти-BCMA антитела связаны с Fc-частью и связь осуществляется посредством С-концевого связывания Fab-фрагмента (-ов) с шарнирным участком. В одном варианте реализации изобретения второй Fab-фрагмент части анти-BCMA антитела связан посредством своего С-конца либо с N-концом Fab-фрагмента анти-CD3 антитела, либо с шарнирным участком Fc-части и поэтому находится между Fc-частью и частью анти-CD3 антитела. Предпочтительные биспецифические антитела показаны на Фиг. 1-3.

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

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

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

Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (биспецифическая форма Фиг. 2С или 2D),

Fc-Fab CD3-Fab BCMA (биспецифическая форма Фиг. 3А или 3В),

Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (биспецифическая форма Фиг. 3С или 3D).

Как показано на фигурах 1-3 «Fab BCMA-Fc», «Fab BCMA-Fc-Fab CD3» и «Fab BCMA-Fc-Fab CD3» обозначают, что Fab-фрагмент (-ы) связан (-ы) посредством своего (-их) С-конца (-ов) с N-концом Fc-фрагмента. «Fab CD3- Fab BCMA» обозначает, что фрагмент Fab CD3 связан своим N-концом с С-концом фрагмента Fab BCMA. «Fab BCMA - Fab CD3» обозначает, что фрагмент Fab BCMA связан своим N-концом с С-концом фрагмента Fab CD3.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит второй Fab-фрагмент указанного анти-BCMA антитела, связанный своим С-концом с N-концом части CD3-антитела, указанного биспецифического антитела. В одном варианте реализации изобретения VL-домен указанной первой части анти-CD3 антитела связан с CH1- или CL-доменом указанного второго анти-BCMA антитела.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит второй Fab-фрагмент указанного анти-BCMA антитела, связанный своим С-концом с Fc-частью (как и первый Fab-фрагмент указанного анти-BCMA антитела) и связан своим N-концом с С-концом части CD3-антитела. В одном варианте реализации изобретения CH1-домен указанной части анти-CD3 антитела связан с VH-доменом указанной второй части анти-BCMA антитела.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-часть, связанную своим N-концом с С-концом Fab-фрагмента указанного CD3-антитела. В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-часть, связанную своим первым N-концом с С-концом Fab-фрагмента указанного CD3-антитела, и второй Fab-фрагмент указанного анти-BCMA антитела, связанный своим С-концом со вторым N-концом Fc-части. В одном варианте реализации изобретения CL-домен Fab-фрагмента CD3-антитела связан с шарнирным участком Fc-части. В одном варианте реализации изобретения CH1-домен Fab-фрагмента BCMA-антитела связан с шарнирным участком Fc-части.

Fab-фрагменты химически связаны вместе путем применения подходящего линкера в соответствии с данным состоянием техники. В одном варианте реализации изобретения используют линкер (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). «Химически связанный» (или «связанный») в соответствии с изобретением означает, что фрагменты связаны ковалентным связыванием. В качестве линкера применяют

пептидный линкер, такое ковалентное связывание обычно выполняется биохимическими рекомбинантными способами, используя нуклеиновую кислоту, кодирующую VL- и/или VH-домены соответствующих Fab-фрагментов, линкер и, при необходимости, цепь Fc-части.

Изобретение, в одном варианте реализации изобретения, относится к биспецифическому антителу против BCMA и CD3 в соответствии с изобретением, характеризующееся тем, что переменный домен VH части анти-CD3 антитела (дополнительно называемый VH CD3) содержит CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи, а переменный домен VL части анти-CD3 антитела (дополнительно называемый CD3 VL) содержит CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи.

В одном варианте реализации изобретения для такого биспецифического антитела, в соответствии с изобретением, характерно, что переменные домены части анти-CD3ε антитела имеют SEQ ID NO:7 и 8.

Изобретение относится к биспецифическому антителу в соответствии с изобретением, характеризующемуся тем, что часть анти-CD3 антитела связана своим N-концом с C-концом части анти-BCMA антитела, а переменные домены VL и VH части анти-CD3 антитела или константные домены CL и CH1 заменены друг другом.

В одном варианте реализации изобретения VH-домен указанной части анти-CD3 антитела связан с CH1- или CL-доменом указанной части анти-BCMA антитела. В одном варианте реализации изобретения VL-домен указанной части анти-CD3 антитела связан с CH1- или CL-доменом указанной части анти-BCMA антитела.

Часть антитела в соответствии с изобретением, в одном варианте реализации изобретения, представляет собой Fab-фрагмент соответствующего антитела.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлено биспецифическое антитело, в котором переменные домены VL и VH в легкой цепи и соответствующей тяжелой цепи части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела заменены друг другом, что характеризуется наличием константного домена CL части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела, причем аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), а в соответствующем константном домене CH1 аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменены глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D). В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой моновалентное антитело для связывания CD3. В одном варианте реализации изобретения

дополнительно к замене аминокислот в положении 124 в константном домене CL аминокислота в положении 123 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (дополнительно называемая «замена заряженного варианта»). В одном варианте реализации изобретения антитело является моновалентным для связывания CD3, а аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело дополнительно содержит еще одну такую же анти-BCMA связывающую часть (в одном варианте реализации Fab-фрагмента). Это также означает, что если первая анти-BCMA связывающая часть содержит замену заряженного варианта, то вторая анти-BCMA связывающая часть содержит такую же замену заряженного варианта. (Нумерация всех аминокислот выполнена согласно Кабату).

Изобретение относится к биспецифическому антителу в соответствии с изобретением, характеризующемуся наличием

- a) первой легкой цепи и первой тяжелой цепи первого антитела, которое специфически связывается с BCMA; и
- b) второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и причем переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и
- c) при этом в константном домене CL первой легкой цепи по a) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и причем в константном домене CH1 первой тяжелой цепи по a) аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменены глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат) (см., например, Фиг. 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

В одном варианте реализации изобретения указанное биспецифическое антитело, описанное в последнем предшествующем параграфе, дополнительно характеризуется тем, что указанное биспецифическое антитело дополнительно содержит Fab-фрагмент указанного первого антитела (дополнительно называемого также BCMA-Fab), а в константном домене CL указанного BCMA-Fab аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и причем в константном домене CH1 указанного BCMA-Fab аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменена глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат) (см. например Фиг. 2A, 2C).

Изобретение дополнительно относится к биспецифическому антителу в соответствии с изобретением, характеризующемуся наличием

- а) первой легкой цепи и первой тяжелой цепи первого антитела, которое специфически связывается с ВСМА; и
- б) второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и причем вариабельные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и при этом
- с) в константном домене CL второй легкой цепи по б) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и причем в константном домене CH1 второй тяжелой цепи по б) аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменены глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат).

В одном варианте реализации изобретения дополнительно к аминокислотной замене в положении 124 в константном домене CL первой и второй легкой цепи аминокислота в положении 123 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H).

В одном варианте реализации изобретения в константном домене CL аминокислота в положении 124 заменена лизином (K), в константном домене CH1 аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 заменены глутаминовой кислотой (E). В одном варианте реализации изобретения дополнительно в константном домене CL аминокислота в положении 123 заменена аргинином (R).

В предпочтительном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело в соответствии с изобретением состоит из одного Fab-фрагмента антитела, специфически связывающегося с CD3 (дополнительно также называемого CD3-Fab), и одного Fab-фрагмента анти-ВСМА антитела в соответствии с изобретением (дополнительно также называемого ВСМА-Fab) и Fc-часть, причем CD3-Fab и ВСМА-Fab связаны посредством своих C-концов с шарнирным участком указанной Fc-части. Либо CD3-Fab, либо ВСМА-Fab содержит ак-замену, а CD3-Fab содержит перекрест (Фиг. 1А и 1В).

В предпочтительном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело в соответствии с изобретением состоит из одного CD3-Fab, одного ВСМА-Fab и Fc-части, причем CD3-Fab и ВСМА-Fab связаны посредством своих C-концов с шарнирным участком указанной Fc-части, и второго ВСМА-Fab, который связан своим C-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо оба ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 2А и 2В). Особенно предпочтительным является биспецифическое антитело, содержащее ВСМА-Fab-Fc-CD3-Fab-ВСМА-Fab, в котором оба ВСМА-Fab

содержат ак-замену, а CD3-Fab содержит перекрест VL/VH (Фиг. 2A). Особенно предпочтительным является биспецифическое антитело, состоящее из ВСМА-Fab-Fc-CD3-Fab-ВСМА-Fab, в котором оба ВСМА-Fab содержат ак-замену Q124K, E123R, K147E и K213E, а CD3-Fab содержит перекрест VL/VH. Особенно предпочтительно, когда оба ВСМА-Fab содержат в качестве CDR – CDR антитела 21, 22 или 42, или в качестве VH/VL – VH/VL антитела 21, 22 или 42.

В предпочтительном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело в соответствии с изобретением состоит из двух ВСМА-Fab и Fc-части, причем один ВСМА-Fab и CD3 Fab связаны посредством своих С-концов с шарнирным участком указанной Fc-части, а второй ВСМА-Fab связан своим С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо оба ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 2A и 2B).

В предпочтительном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело в соответствии с изобретением состоит из двух ВСМА-Fab и Fc-части, причем ВСМА-Fab связаны посредством своих С-концов с шарнирным участком указанной Fc-части, и CD3-Fab, который связан своим С-концом с N-концом одного ВСМА-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо оба ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 2C и 2D).

В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением состоит из одного CD3-Fab, который связан посредством своего С-конца с шарнирным участком указанной Fc-части, и ВСМА-Fab, который связан своим С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 1A и 1B).

В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением состоит из одного CD3-Fab, который связан посредством своего С-конца с шарнирным участком указанной Fc-части, и ВСМА-Fab, который связан своим С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 3A и 3B).

В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением состоит из одного ВСМА-Fab, который связан посредством своего С-конца с шарнирным участком указанной Fc-части, и CD3-Fab, который связан своим С-концом с N-концом ВСМА-Fab. CD3-Fab содержит перекрест и либо CD3-Fab, либо ВСМА-Fab содержат ак-замену (Фиг. 3C и 3D).

Fab-фрагменты химически связаны вместе путем применения подходящего линкера в соответствии с данным состоянием техники. В одном варианте реализации изобретения используют линкер (Gly4-Ser1)3 (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Связь между двумя Fab-фрагментами осуществляется между тяжелыми цепями.

Поэтому С-конец CH1 первого Fab-фрагмента связан с N-концом VH второго Fab-фрагмента (без перекреста) или с VL (с перекрестом). Связь между Fab-фрагментом и Fc-частью осуществляется, в соответствии с изобретением, в виде связи между CH1 и CH2.

Первый и второй Fab-фрагменты антитела, специфически связывающиеся с ВСМА, в одном варианте реализации изобретения, происходят их одного и того же антитела и, в одном варианте реализации изобретения, идентичны по последовательностям CDR, последовательностям переменных доменов VH и VL и/или последовательностям константных доменов CH1 и CL. В одном варианте реализации изобретения аминокислотные последовательности первого и второго Fab-фрагмента антитела, специфически связывающегося с ВСМА, являются идентичными. В одном варианте реализации изобретения ВСМА-антитело представляет собой антитело, содержащее последовательности CDR антитела 21, 22 или 42, антитела, содержащего последовательности VH и VL антитела 21, 22 или 42, или антитела, содержащего последовательности VH, VL, CH1 и CL антитела 21, 22 или 42.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит в качестве Fab-фрагментов и Fc-части не более одного Fab-фрагмента анти-CD3 антитела, не более двух Fab-фрагментов анти-ВСМА антитела и не более одной Fc-части в одном варианте реализации Fc-части человека. В одном варианте реализации изобретения второй Fab-фрагмент анти-ВСМА антитела связан посредством своего С-конца либо с N-концом Fab-фрагмента анти-CD3 антитела, либо с шарнирным участком Fc-части. В одном варианте реализации изобретения связь осуществляется между CH1 ВСМА-Fab и VL CD3-Fab (перекрест VL/VH).

В одном варианте реализации изобретения часть антитела, специфически связывающаяся с CD3 человека, в одном варианте реализации изобретения Fab-фрагмент, характеризуется наличием переменного домена VH, содержащим CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи и переменного домена VL, содержащего CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD3ε антитела (CDR MAB CD3). В одном варианте реализации изобретения часть антитела, специфически связывающаяся с CD3 человека, характеризуется тем, что переменные домены содержат SEQ ID NO:7 и 8 (VHVL MAB CD3).

Изобретение относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с внеклеточным доменом ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующемуся наличием набора тяжелых и легких цепей, выбранных из группы, состоящей из полипептидов

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

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

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

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело в соответствии с изобретением характеризуется тем, что СНЗ-домен одной тяжелой цепи и СНЗ-домен другой тяжелой цепи, каждый встречается с поверхностью, которая включает исходную поверхность между СНЗ-доменами антитела; причем указанная поверхность изменена для облегчения образования биспецифического антитела, при этом изменение характеризуется тем, что

- a) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая встречается с исходной поверхностью СНЗ-домена другой тяжелой цепи в пределах биспецифического антитела, аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим более объемную боковую цепь, тем самым создавая выпуклость на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая допускает размещение в полости поверхности СНЗ-домена другой тяжелой цепи, а
- b) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности второго СНЗ-домена, которая встречается с исходной поверхностью первого СНЗ-домена в пределах биспецифического антитела, аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим менее объемную боковую цепь, тем самым создавая полость на поверхности второго СНЗ-домена, в которой допускается размещение выпуклости поверхности первого СНЗ-домена.

В одном варианте реализации изобретения такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий более объемную боковую цепь, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

В одном варианте реализации изобретения такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий менее объемную боковую группу, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T), валина (V).

В одном варианте реализации изобретения такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что оба СНЗ-домена дополнительно изменены путем введения цистеина (C), в виде аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена.

В одном варианте реализации изобретения такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что один из константных доменов СНЗ тяжелой цепи обеих тяжелых цепей заменены константным доменом СН1 тяжелой цепи; а другой константный домен СНЗ тяжелой цепи заменен константным доменом СL легкой цепи.

Изобретение дополнительно относится к антителу в соответствии с изобретением, содержащему модифицированную Fc-часть, индуцирующую гибель клеток на 20 % или больше клеток из препарата ВСМА-экспрессирующих клеток через 24 часа при концентрации указанного антител 100 нМ по механизму АЗКЦ относительно контроля в идентичных условиях с использованием того же антитела с исходной Fc-частью в качестве контроля. Такое антитело, в одном варианте реализации изобретения, представляет собой голое антитело.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением представляет собой антитело с количеством фукозы 60 % или менее от общего количества олигосахаридов (углеводов) на Asn297 (см., например, US20120315268).

В одном варианте реализации изобретения Fc-часть содержит аминокислотные замены, которые введены в Fc-часть человека и описаны в SEQ ID NO:55 и 56.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлен химерный антигенный рецептор (CAR) анти-ВСМА антитела в соответствии с изобретением. В таком варианте реализации изобретения анти-ВСМА антитело состоит из одноцепочечного VH- и VL-домена антитела в соответствии с изобретением и CD3-дзета трансмембранного и эндодомена. Предпочтительно домен CD3-дзета связан посредством спейсера с C-концом указанного VL-домена, а N-конец VL-домена связан посредством спейсера с C-концом указанного VH-домена. Химерные антигенные рецепторы ВСМА-антител, приемлемые трансмембранные домены и эндодомены и способы их продукции описаны, например, в Ramadoss NS. et al., J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015), Carpenter RO et al., Clin. Cancer. Res. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013), WO2015052538 и WO2013154760.

Дополнительно в вариантах реализации изобретения представлены антитела Mab21, Mab22, Mab42, Mab27, Mab33 и Mab39, описанные в данном документе по их CDR-последовательностям и/или VH/VL-последовательностям, вместе с описанными CL- и CH1-последовательностями, антигенсвязывающие фрагменты, особенно Fab-фрагменты, биспецифические антитела, связывающиеся с ВСМА и CD3, с и без Fc-части, биспецифические антитела в описанных формах, особенно форма 2+1, и биспецифические антитела с тяжелыми и легкими цепями, как описано в данном документе, особенно как описано в табл. 1А.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлен способ получения анти-ВСМА антитела, которое деплетирует (снижает количество), в биспецифической форме в соответствии с изобретением, злокачественные плазматические клетки человека в аспиратах множественной миеломы костного мозга до по меньшей мере 80 % после 48 часов лечения в концентрации между 10 нМ до 1 фМ включительно, охарактеризованные по методу пэннинга вариабельной тяжелой цепи (VH) и

вариабельной легкой цепи (VL) библиотеки фагового дисплея антитела 83A10 (библиотека VH, библиотека VL) с 1-50 нМ ВСМА яванского макака в 1-3 циклах и при отборе вариабельной легкой цепи и вариабельной тяжелой цепи, которые имеют такие свойства, как биспецифическое связывающее Т-клетки антитело. Предпочтительно пэннинг осуществляют в 3 циклах с использованием 50 нМ ВСМА яванского макака для цикла 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для цикла 2 и 10 нМ ВСМА яванского макака для цикла 3. Предпочтительно библиотеки рандомизируют либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи, либо CDR1 и CDR2 тяжелой цепи. Предпочтительно идентифицируют легкую и тяжелую цепи, каждая из которых связывает Fab-фрагмент, содержащий в дополнение соответствующий VH или VL антитела 83A10, huBCMA с Kd от 50 пМ до 5 нМ и ВСМА яванского макака с Kd от 0,1 нМ до 20 нМ. Предпочтительно биспецифическая форма представляет собой форму по Фиг. 2А, включающую соответствующие константные домены VL и VH замены CD3 Fab друг другом и в пределах обоих аминокислотных замен Fab BCMA K213E K147E в CH1-домене и аминокислотных замен E123R и Q124K в CL-домене.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлен способ получения антитела в соответствии с изобретением, включающий этапы

- a) трансформирования клетки-хозяина
- b) векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела в соответствии с изобретением,
- c) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез указанной молекулы антитела и
- d) выделения указанной молекулы из указанной культуры.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлен способ получения биспецифического антитела в соответствии с изобретением, включающий этапы

- e) трансформирования клетки-хозяина
- f) векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первой мишенью,
- g) векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со второй мишенью, причем вариабельные домены VL и VH или константные домены CL и CH1, заменяют друг друга;
- h) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез указанной молекулы антитела и
- i) выделения указанной молекулы из указанной культуры.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена клетка-хозяин, содержащая векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитело в соответствии с изобретением. В дополнительном варианте реализации изобретения представлена клетка-хозяин, содержащая векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первой мишенью, и векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со второй мишенью, причем переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1, заменяют друг друга.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства при лечении нарушений, связанных с плазматическими клетками.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства при лечении множественной миеломы.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства при лечении системной красной волчанки.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, включая мультиспецифическое антитело, голое антитело с улучшенной АЗКЦ, конъюгат антитела-лекарственного средства, мультиспецифическое антитело или биспецифическое антитело для применения в качестве лекарственного средства при лечении антитело-опосредованного отторжения.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением можно применять для лечения связанных с плазматическими клетками нарушений, как множественная миелома (ММ) или другие связанные с плазматическими клетками нарушения, при которых экспрессируется ВСМА, как описано ниже. ММ представляет собой плазматическое злокачественное заболевание,

характеризующееся моноклональным распространением и накоплением аномальных плазматических клеточек в компартменте костного мозга. При ММ также происходит циркуляция клональных клеток плазматических клеточек с одинаковой перестройкой генов IgG и соматической гипермутацией. ММ возникает вследствие асимптоматического, предракового патологического состояния, называемого моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ), которое характеризуется низкими уровнями плазматических клеточек костного мозга и моноклонального белка. Клетки ММ пролиферируют с малой скоростью. ММ возникает из прогрессирующего образования множественных структурных хромосомных изменения (например, несбалансированных транслокаций). При ММ происходит согласованное взаимодействие злокачественных плазматических клеточек и микроокружения костного мозга (например, нормальных стромальных клеток костного мозга). Клинические признаки активной ММ включают резкое возрастание количества моноклональных антител, переполнение плазматическими клетками костного мозга, литическими очагами в костной ткани и разрушение костной ткани, возникающее из-за сверхстимуляции остеокластов (Dimopoulos & Terpos, *Ann Oncol* 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Другое нарушение плазматических клеточек вовлекает плазматические клетки, т. е. экспрессия ВСМА представляет собой системную красную волчанку (СКВ), также известную как волчанка. СКВ представляет собой системное аутоиммунное заболевание, которое может поражать любую часть организма и проявляющееся в атаке иммунной системой собственных клеток и тканей организма, что приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей. Это проявление реакции гиперчувствительности III типа, при которой осаждаются аутоиммунные комплексы и вызывают дальнейший иммунный ответ (Inaki & Lee, *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 326-337). Последующие связанные с плазматическими клетками нарушения представляют собой плазмоклеточный лейкоз и AL-амилоидоз (см. также примеры 19 и 20). При этих связанных с плазматическими клетками нарушениях предполагается, что деплетирование плазматических клеточек/злокачественных плазматических клеточек антителами в соответствии с этим изобретением, должно приносить пользу пациентам, страдающим от такого заболевания.

В дополнительном варианте реализации этого изобретения представлено антитело в соответствии с изобретением для лечения антитело-опосредованного отторжения аллотрансплантата, вовлекающего плазматические клетки и аллоантитела, включая острое и хроническое антитело-опосредованное отторжение (АОО). Острое АОО характеризуется дисфункцией трансплантата, которое происходит через несколько дней и является результатом либо предварительно образованных, либо образовавшихся *de novo* после трансплантации донорских специфических антител. Отторжение происходит в около 5–7 % от всех трансплантантов и вызывает 20–48 % случаев острого отторжения среди предсенсублизированных пациентов с положительной перекрестной пробой (Colvin and Smith, *Nature Rev Immunol* 2005; 5 (10): 807-817). Гистопатология у пациентов с острым АОО часто

проявляется в выделении эндотелиальных клеток, нейропатической инфильтрации из гломерул и перитубулярных капилляров, фибриновых тромбах, интерстициальной отеке и кровотечениях (Trpkov et al. *Transplantation* 1996; 61 (11): 1586-1592). АОО может идентифицироваться с помощью С4d-окрашивания или других улучшенных методов обнаружения антител в биоптатах аллотрансплантатов. Другая форма АОО также известная как хроническое повреждение аллотрансплантата, при которой также участвуют донорские специфические антитела, но она проявляется в течение месяцев и даже лет после трансплантации. Она выражается как гломерулопатия трансплантата (также известная как хроническая гломерулопатия аллотрансплантата) при проведении биопсий почек и характеризуется гломерулярным мезангиальным расширением и удвоением базальной мембраны капилляров (Regele et al. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (9): 2371-2380). Клинические проявления могут варьировать среди пациентов, проходя асимптоматически на ранних стадиях с возникновением ряда нефротических протеинурий, повышенного давления и дисфункции аллотрансплантата на поздних стадиях. Прогрессирование заболевания может быть достаточно быстрым, особенно с сохраняющимся ААО, приводя к недостаточности трансплантата в течение месяцев (Fotheringham et al. *Nephron – Clin Pract* 2009; 113 (1): с1-с7). Частота распространения гломерулопатии трансплантата при проведении биопсий у пациентов варьирует от 5 % через 1 год до 20 % через 5 лет (Cosio et al. *Am J Transplant* 2008; 8: 292-296).

В дополнительном варианте реализации изобретения представлено антитело в соответствии с изобретением для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая голое антитело или биспецифическое антитело в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением с повышенной эффекторной функцией, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением с пониженной эффекторной функцией, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, в виде биспецифического антитела для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, в виде мультиспецифического антитела для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, в виде конъюгата с терапевтическим средством (конъюгатом лекарственного средства), например, с цитотоксическим средством или радиоактивной меткой для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением, в виде диатела для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением, особенно в виде биспецифического антитела против CD3 и BCMA, вводят один раз или два раза в неделю, в одном варианте реализации изобретения, посредством подкожного введения (например, в одном варианте реализации изобретения, в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно до 25 мг/м²/неделю, предпочтительно до 250 мг/м²/неделю). Благодаря превосходной цитотоксической активности антитела в соответствии с изобретением его можно вводить по меньшей мере в таком же объеме клинического диапазона доз (или даже меньшем) по сравнению с традиционными моноспецифическими антителами или традиционными биспецифическими антителами, которые не являются биспецифическими для T-клеток (т. е. не связываются с CD3 на одном плече). Предусмотрено, что для антитела в соответствии с изобретением в условиях клиники предпочтительно подкожное введение (например, в диапазоне доз 0,1 – 250 мг/м²/неделю). В дополнение к этому, для пациентов с высокими уровнями сывороточных APRIL и BAFF (например, пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличивать дозу антитела в соответствии с изобретением, так как оно может не подвергаться конкуренции с лигандами. И наоборот, у таких пациентов могут потребоваться увеличения доз других блокирующихся лигандами/конкурирующих анти-BCMA антител. Другим преимуществом антитела в соответствии с изобретением является получение периода полувыведения от около 4 до 12 суток, что позволяет проводить введение по меньшей мере один или два раза в неделю.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением в случае голого/неконъюгированного моноспецифического антитела с улучшенной АЗКЦ, представляет собой

антитело со свойствами, позволяющими проводить лечение один/два раза в неделю внутривенным путем, но предпочтительно путем подкожного введения (например, с дозировкой в диапазоне 200-2000 мг/м/неделю в течение 4 недель). Предусмотрено, что для антитела в соответствии с изобретением в условиях клиники возможно и предпочтительно подкожное введение (например, в диапазоне доз 200-2000 мг/м²/неделю в зависимости от показаний при заболевании). В дополнение к этому, у пациентов с высокими уровнями сывороточных APRIL и BAFF (например, пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличивать дозу антитела в соответствии с изобретением (например, неблокирующегося лигандами/конкурирующего антитела), так как оно может не подвергаться конкуренции с лигандами. И наоборот, у таких пациентов могут потребоваться увеличения доз других блокирующихся лигандами/конкурирующих анти-BCMA антител, делая подкожные введения технически более сложными (например, фармацевтически). Другое преимущество антитела в соответствии с изобретением основано на включении Fc-части, которая связана с периодом полувыведения от 4 до 12 суток и позволяет проводить введение по меньшей мере один или два раза в неделю.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения представлена диагностическая композиция, содержащая антитело в соответствии с изобретением.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Биспецифические бивалентные антитела, содержащие только Fab-фрагменты (специфические к CD3 и BCMA) и Fc-часть, как указано: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE). Ак-замены для RK/EE введены в CL-CH1 для снижения неправильного спаривания LC/образования побочных продуктов при получении. Fab CD3 содержит перекрест VL-VH для снижения неправильного спаривания LC и образования побочных продуктов.

Фигура 2. Предпочтительные биспецифические тривалентные антитела, содержащие только Fab-фрагменты (специфические к CD3 и BCMA) и Fc-часть, как указано: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). Ак-замены для RK/EE введены в CL-CH1 для снижения неправильного спаривания LC/образования побочных продуктов при получении. Предпочтительно Fab CD3 содержит перекрест VL-VH для снижения неправильного спаривания LC и образования побочных продуктов. Предпочтительно Fab CD3 и Fab BCMA связаны друг с другом гибкими линкерами.

Фигура 3. Биспецифические бивалентные антитела, содержащие только Fab-фрагменты (специфические к CD3 и BCMA) и Fc-часть, как указано: (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA/EE; (B) Fc-Fab

CD3/EE)-Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA/EE)-Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3/EE). Предпочтительно Fab CD3 содержат перекрест VL-VH для снижения неправильного спаривания LC и образования побочных продуктов. Fab CD3 и Fab BCMA связаны друг с другом гибкими линкерами.

Фигура 4. Перенаправленный лизис Т-клетками клеток H929 MM, индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено по высвобождению LDH. Кривые концентрации-ответа для лизиса клеток H929 MM, индуцированного 21-TCVsv (закрашенный круг), 22-TCVsv (закрашенный треугольник), 42-TCVsv (закрашенный квадрат), по сравнению с 83A10-TCVsv (незакрашенный круг, штриховая линия). Для всех анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток отмечена зависимость от концентрации гибель клеток H929, тогда как с контрольным TCV гибели не наблюдали. Эксперименты выполняли с МКПК донора 1 (А), донора 3 (В), донора 4 (С), донора 5 (D) с использованием соотношения эффекторных клеток и опухолевых клеток-мишеней (Е:Т) 10 МКПК к 1 клетке MM (см. пример 8).

Фигура 5. Перенаправленный лизис Т-клетками клеток L363 MM, индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено по высвобождению LDH. Кривые концентрации-ответа для лизиса клеток L363 MM, индуцированного 21-TCVsv (закрашенный круг), 22-TCVsv (закрашенный треугольник), 42-TCVsv (закрашенный квадрат), по сравнению с 83A10-TCVsv (незакрашенный круг, штриховая линия). Для всех анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток наблюдали зависимость от концентрации гибель клеток L363, тогда как с контрольным TCV гибели не наблюдали. Эксперименты выполняли с МКПК донора 1 (А), донора 2 (В), донора 3 (С), донора 4 (D), донора 5 (Е) с использованием соотношения эффекторных клеток и опухолевых клеток-мишеней (Е:Т) 10 МКПК к 1 клетке MM (см. пример 9).

Фигура 6. Перенаправленный лизис Т-клетками клеток RPMI-8226 MM, индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено по высвобождению LDH. Кривые концентрации-ответа для лизиса клеток RPMI-8226 MM, индуцированного 21-TCVsv (закрашенный круг), 22-TCVsv (закрашенный треугольник), 42-TCVsv (закрашенный квадрат), по сравнению с 83A10-TCVsv (незакрашенный круг, штриховая линия). Для всех анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток наблюдали зависимость от концентрации гибель клеток RPMI-8226, тогда как с контрольным TCV гибели не наблюдали. Эксперименты выполняли с МКПК донора 2 (А), донора 3 (В), донора 4 (С), донора 5 (D) с использованием соотношения эффекторных клеток и опухолевых клеток-мишеней (Е:Т) 10 МКПК к 1 клетке MM (см. пример 10).

Фигура 7. Перенаправленный лизис Т-клетками клеток JJN-3, индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии. Зависимость от

концентрации гибель клеток JN-3 под действием 22-TCV_{cy} (закрашенный треугольник), 42-TCV_{cy} (закрашенный квадрат), по сравнению с 83A10-TCV_{cy} (незакрашенный круг, штриховая линия). Определяли и отмечали на графике процентное содержание аннексин-V-позитивных клеток JN-3 (A, C) и лизис опухолевых клеток (B, D). Процент лизиса клеток JN-3, индуцированного конкретной концентрацией анти-BCMA/анти-CD3 биспецифического антитела Т-клеток, определенной согласно следующего описания: абсолютное число аннексин-V-негативных клеток JN-3 при данной концентрации ТСВ и вычитание его из абсолютного числа аннексин-V-негативных клеток JN-3 без использования ТСВ, деленное на абсолютное число аннексин-V-негативных клеток JN-3 без использования ТСВ. Эксперименты выполняли с МКПК 2-х доноров: доноров 1 (A, B) и доноров 2 (C, D) с использованием соотношения Е:Т 10 МКПК к 1 клетке ММ (см. пример 11).

Фигура 8. Перенаправленный лизис Т-клетками миеломных плазматических клеткок костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологических инфильтрирующих костный мозг Т-клеток (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом многопараметровой проточной цитометрии. Процентное содержание аннексин-V-позитивных миеломных плазматических клеткок определяли и отмечали на графике по сравнению с концентрациями ТСВ. Наблюдали зависимость от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеткок пациента без наблюдения лизиса Т-клеток, В-клеток и НК-клеток на основании 8-цветного многопараметрового набора. Не отмечена индукция клеточной гибели миеломных плазматических клеткок с помощью контрольного ТСВ при наибольшей концентрации исследованных антител ТСВ. По сравнению с ними более активными в отношении индукции гибели миеломных плазматических клеткок костного мозга пациента были 83A10-TCV_{cy} (A), 42-TCV_{cy} (B) и 22-TCV_{cy} (C) (см. пример 13).

Фигура 9. Перенаправленный лизис Т-клетками миеломных плазматических клеткок костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологических инфильтрирующих костный мозг Т-клеток (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии. Процентное содержание аннексин-V-негативных миеломных плазматических клеткок определяли и отмечали на графике по сравнению с концентрациями ТСВ. Наблюдали зависимость от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеткок пациента без наблюдения лизиса незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеткок с помощью контрольного ТСВ при наибольшей концентрации исследованных антител ТСВ (данные не показаны). По сравнению с ними более активными в отношении индукции гибели миеломных плазматических клеткок костного мозга пациента были 83A10-TCV_{cy}, 42-TCV_{cy} и 22-TCV_{cy}, что отображено зависимым от концентрации

снижением жизнеспособных (аннексин-V-негативных) миеломных плазматических клеток. Репрезентативные эксперименты для пациента 001 (А) и пациента 007 (В) (см. пример 13).

Фигура 10. Перенаправленный лизис Т-клетками миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологических инфильтрирующих костный мозг Т-клеток, индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии. Определяли процентное содержание негативных по пропидию йодиду миеломных плазматических клеток, и отмечали на графике зависимость процентного содержания жизнеспособных плазматических клеток костного мозга относительно контроля со средой (МС) от концентраций ТСВ. Наблюдали зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента (А – G) без наблюдения лизиса микроокружения костного мозга (ВММЕ) (Н). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с помощью контрольного ТСВ при наибольшей концентрации исследованных антител ТСВ. По сравнению с ними более активными в отношении индукции гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента были 83A10-ТСВсv, 42-ТСВсv и 22-ТСВсv, что отображено зависимым от концентрации снижением жизнеспособных (негативных по пропидию йодиду) миеломных плазматических клеток. Влияние считалось статистически значимым, если значение Р- его соответствующего статистического критерия составляло $<5\%$ (*), $<1\%$ (**) или $<0,1\%$ (***). Эксперименты выполняли с использованием образцов аспирата костного мозга, отобранных у пациента 1 (А), пациента 2 (В), пациента 3 (С), пациента 4 (D), пациента 5 (Е), пациента 6 (F) и пациента 7 (G, H) (см. пример 13).

Фигура 11. Активация Т-клеток костного мозга пациента с миеломой в присутствии плазматических клеток костного мозга (аспираты цельного костного мозга пациента), индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом многопараметровой проточной цитометрии (8-цветный окрашивающий набор). Величину активации Т-клеток сравнивали среди 83A10-ТСВсv (А), 42-ТСВсv (В) и 22-ТСВсv (С) (см. пример 14).

Фигура 12. Концентрации 83A10-ТСВсv измеряли в образцах сыворотки (закрашенные символы со сплошными линиями) и образцах костного мозга (незакрашенные символы с штриховыми линиями) после однократной внутривенной (ВВ) инъекции яванским макакам 0,003, 0,03 и 0,1 мг/кг 83A10-ТСВсv. Выполняли отбор образцов сыворотки до введения доз и через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения доз. Образцы костного мозга отбирали до введения доз и через 96 и 336 ч после введения доз (см. пример 16).

Фигура 13. У яванских макак наблюдали перераспределение периферических Т-клеток после однократной ВВ-инъекции 83A10-TCVscv (0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг). Животные А и В, С и D, и Е и F, соответственно, получали ВВ-инъекцию 0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг 83A10-TCVscv. Абсолютные числа клеток Т-клеток крови (CD2+ клеток на мкл крови) отмечали на графике по сравнению со временем после лечения (см. пример 16).

Фигура 14. У яванских макак наблюдали снижение плазматических клеткок крови после однократной ВВ-инъекции 83A10-TCVscv (0,3 мг/кг), как измерено методом многопараметровой проточной цитометрии. Плазматические клетки (PC) идентифицировали на основе 6-цветного окрашивающего набора, измеряли и отмечали на контурных графиках (А) процентные превышения PC над лимфоцитами. На графике (В) отмечена кинетика деплетирования плазматических клеткок крови после лечения с помощью 0,3 мг/кг 83A10-TCVscv яванских макак (см. пример 16).

Фигура 15. Противоопухолевая активность, индуцированная 83A10-TCVscv, анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическим антителом Т-клеток в модели ксенотрансплантата миеломы H929 человека с использованием МКПК-гуманизированных NOG-мышей. Иммунодефицитные NOD/Shi-scid IL2r-гамма(нуль) (NOG) мыши на сутки 0 (d0) получали клетки множественной миеломы человека H929 в виде подкожной (ПК) инъекции в правую область спины. На сутки 15 (d15) NOG-мыши получали однократную внутрибрюшинную (ВВ) инъекцию МКПК человека. Затем мышей тщательно случайным образом распределяли на различные группы лечения и контрольные группы (n=9/группу) и выполняли статистическое исследование для исследования гомогенности между группами. Экспериментальные группы представляли собой контрольную не получавшую лечения группу, получавшую лечение контрольным TCV группу, получавшую лечение 2,6 нМ/кг 83A10-TCVscv группу и получавшую лечение 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® (BCMAxCD3 (scFv)₂) группу. Лечение антителами производили путем инъекции в хвостовую вену, начавшееся на сутки 19 (d19), т. е. 19 суток после ПК-инъекции опухолевых клеток H929. Схема лечения антителами TCV состояла из еженедельного ВВ-введения в течение до 3 недель (т. е. всего 3 инъекции антитела TCV). Во время исследования измеряли объем опухолей (TV) штангенциркулем и оценивали прогрессирование путем сравнения TV между группами. Отмечали на графике TV (мм³) в зависимости от дня после инъекции опухолей. На d19, первый день лечения, средний объем опухоли достиг 300 ± 161 мм³ для леченной носителем контрольной группы (А), 315 ± 148 мм³ для получавшей лечение 2,6 нМ/кг контрольного TCV группы (А), 293 ± 135 мм³ для получавшей 2,6 нМ/кг 83A10-TCVscv группы (В) и 307 ± 138 мм³ для получавшей 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® группы (С). Значение TV каждой отдельной мыши в экспериментальной группе отмечали на графике в зависимости от суток после инъекции опухолей: (А) контрольные группы, включали получавшую контрольный носитель (сплошная линия) и контрольный TCV (штриховая линия), (В) 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг) группу и (С) BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг). Черные стрелки

показывают лечение ТСВ, предоставляемое ВВ-инъекцией. В получавшей 83A10-ТСВсв (2,6 нМ/кг) группе 6 из 9 мышей (67 %) имели опухоли, регрессировавшие ниже значений TV, зафиксированных на d19, т. е. первое лечения с помощью ТСВ, а регрессия опухолей сохранялась до завершения исследования. У 3 мышей, в получавшей лечение 83A10-ТСВсв (2,6 нМ/кг) группе, для которых не удалось показать регрессию опухоли, были значения TV равные, соответственно, 376, 402 и 522 мм³ на d19. В противоположность этому, ни у одной из 9 мышей (0 %), которых лечили эквивалентной дозой ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) по схеме раз в неделю в течение 3 недель, имели регрессию опухолей в любой момент времени (см. пример 17).

Фигура 16. Процентные значения роста опухоли (TG) рассчитывали в течение от d19 до d43 и сравнивали между получавшими 83A10-ТСВсв (2,6 нМ/кг) и ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) группами. Процентные значения роста опухоли, определенное как TG, определяли путем расчета $TG (\%) = 100 \times (\text{медиана TV анализируемой группы}) / (\text{медиана TV получавшей носитель контрольной группы})$. По этической причине мышей подвергали эвтаназии, когда TV достигало по меньшей мере 2000 мм³. Значение TG (%) согласованно и значимо снижалось в получавшей 83A10-ТСВсв (2,6 нМ/кг) группе, а также TG (%) всегда было ниже по сравнению с ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) (см. пример 17).

Фигура 17. Данные поверхностного плазмонного резонанса (ППР) 70 клонов, отобранных при проведении ELISA. Все эксперименты выполняли при 25 °С с использованием в качестве подвижного буфера PBST (10 мМ ФСБ, рН 7,4 и 0,005 % (об./об.) Tween®20) на приборе ProteOn XPR36, оборудованном биосенсором с сенсорными чипами GLC и GLM, и с реактивами для связывания. Иммуобилизации выполняли при 30 мкл/мин на чипе GLM. Связывали pAb (козла) анти-hu IgG, F(ab)2 специфическое Ab (Jackson) в вертикальном направлении с использованием стандартной аминокислотной процедуры: все шесть каналов для лигандов активировали в течение 5 мин со смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Непосредственно после активации поверхностей pAb (козла) анти-hu IgG, F(ab)2 специфическое антитело (50 мкл/мл, 10 мМ ацетат натрия, рН 5) вводили во все шесть каналов в течение 5 мин. В конце каналы блокировали с помощью инъекции 1 М этаноламина-HCl (рН 8,5) в течение 5 мин. Конечные уровни иммуобилизации были аналогичны для всех каналов, составляя в диапазоне от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab захватывались из супернатантов *E. coli* путем одновременного введения вдоль пяти отдельных целых горизонтальных каналов (30 мкг/мл) в течение 5 мин и это приводило к уровням в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; кондиционированную среду вводили вдоль шестого канала для обеспечения «параллельно работающего» холостого опыта для целей использования двойного эталона. Одноступенчатые кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека и яванского макака (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин вдоль вертикальных каналов. Диссоциацию отслеживали в течение 5 мин. Данные по кинетике

анализировали в программе ProteOn Manager v. 2.1. Обработка данных для пятна реакции вовлекала применение эталона, полученного при сравнении между пятнами, и стадии измерения двойного эталона с использованием параллельного холостого буферного раствора (Myszka, 1999). Обработанные данные от повторных одноступенчатых введений подбирали по простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Фигура 18. Аффинность связывания ВСМА-антител на клетках НЕК-huBCMA при измерении методом проточной цитометрии. Анти-ВСМА антитела применяли в качестве первого антитела, затем в качестве антитела для выявления использовали вторичное PE-меченое антитело против Fc человека. Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значимо лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК.

Фигура 19. Концентрации 42-ТСВсv измеряли в сыворотке и костном мозге после однократной ВВ- или ПК-инъекции яванским макакам. Животные получали однократную ВВ- или ПК-инъекцию 42-ТСВсv) и у них отбирали образцы крови в каждый момент времени из периферической вены для ФК-оценок до введения доз, через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения доз. Образцам крови давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученную сыворотку непосредственно хранили при -80 °С до последующего анализа. Образцы костного мозга для ФК-оценки также отбирали из бедренной кости под анестезией/обработкой анальгетиками до введения доз, через 96 и 336 ч после введения доз. Образцам костного мозга давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученный костный мозг непосредственно хранили при -80 °С до последующего анализа. Выполняли анализ и оценку ФК-данных. Выполняли стандартный анализ без компартментов с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, штат Массачусетс, США) или систему Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Диапазон эффективных концентраций 42-ТСВсv в аспиратах костного мозга пациента с множественной миеломой соответствовал от 10 пМ до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ.

Фигура 20. Перенаправленный лизис Т-клетками лейкозных клеток костного мозга пациента с плазмноклеточной миеломой в присутствии аутологических Т-клеток или инфильтрирующих костный мозг Т-клеток, индуцированный анти-ВСМА/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии. Определяли процентное содержание негативных по пропидию йодиду миеломных плазматических клеточки отмечали на графике зависимость процентного содержания жизнеспособных плазматических лейкозных клеток костного мозга относительно контроля со средой (МС) от концентраций ТСВ. Зависимый от концентрации и специфический лизис

плазматических лейкозных клеток пациента наблюдали (А, В), в то время как лизиса микроокружения костного мозга (ВММЕ) не наблюдался (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с помощью контрольного ТСВ при наибольшей концентрации исследованных антител ТСВ. Очень активными в отношении индукции гибели плазматических лейкозных клеток костного мозга пациентов были 42-ТСВ_{св}, что отображено зависимым от концентрации снижением жизнеспособных (негативных по пропидию йодиду) миеломных плазматических клеток. Влияние считалось статистически значимым, если значение Р-его соответствующего статистического критерия составляло <5 % (*), < 1 % (**), или <0,1 % (***). На фигуре показаны результаты, полученные из образцов костного мозга пациента 1(А) и пациента 2(В) (см. также пример 20).

Подробное описание изобретения

Термин «BCMA, BCMA-мишень, BCMA человека», используемый в данном документе, относится к антигену созревания В-клеток человека, также известному как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), который представляет собой представителя суперсемейства рецепторов некроза опухолей, преимущественно экспрессирующийся в дифференцированных плазматических клетках. Внеклеточный домен BCMA состоит в соответствии с UniProt из аминокислот 1 – 54 (или 5-51). Термин «антитело против BCMA, анти-BCMA антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, специфически связывающемуся с внеклеточным доменом BCMA.

Выражения «специфически связывающееся с BCMA или связывающееся с BCMA» относятся к антителу, которое способно связываться с BCMA-мишенью с достаточной аффинностью, при которой антитело может использоваться в качестве терапевтического средства для нацеливания на BCMA. В некоторых вариантах реализации степень связывания анти-BCMA антитела с неспецифическим белком, не являющимся белком BCMA, составляет около 10-кратное, предпочтительно >100-кратное меньшее связывания антитела с BCMA при измерении, например, методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например Biacore®, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) или проточной цитометрией (FACS). В одном варианте реализации изобретения антитело, которое связывается с BCMA, имеет константу диссоциации (Kd) 10^{-8} М или менее, предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-13} М, предпочтительно от 10^{-9} М до 10^{-13} М. В одном варианте реализации изобретения анти-BCMA антитело связывается с эпитопом BCMA, который является консервативным среди BCMA из различных видов, предпочтительно человека и яванского макака, и в дополнение предпочтительно также BCMA мыши и крысы. Выражение «биспецифическое антитело специфически связывается с CD3 и BCMA, биспецифическое антитело против CD3 и BCMA» относится к соответствующему

определению для связывания с обеими мишенями. Антитело, специфически связывающееся с ВСМА (или ВСМА и CD3) не связывается с другими антигенами человека. Поэтому в анализе ELISA значения ОП для таких нерелевантных мишеней будут равны или ниже значений, которые ограничивают выявление для специфического анализа, предпочтительно $> 0,3$ нг/мл, или равны или ниже значений ОП контрольных образцов без связанного с планшетами ВСМА или с трансфицированными клетками НЕК293.

Предпочтительно анти-ВСМА антитело специфически связывается с группой ВСМА, состоящей из ВСМА человека и ВСМА млекопитающего нечеловеческого происхождения, предпочтительно ВСМА от яванского макака, мыши и/или крысы. «Гэп яванского макака/человека» относится к соотношению аффинностей KD ВСМА яванского макака [M]/KD ВСМА человека [M] (подробности см. в примере 3). «Гэп Mab CD3 яванского макака/человека», используемый в данном документе, относится к соотношению аффинностей KD CD3 яванского макака [M]/KD CD3 человека [M]. В одном варианте реализации изобретения биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 антитело по данному изобретению показывает диапазон аффинности Mab CD3 яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Биспецифическое антитело в соответствии с изобретением в одном варианте реализации характеризуется тем, что оно специфически связывается также с CD3 яванского макака. В одном варианте реализации изобретения биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 антитело по данному изобретению показывает диапазон аффинности Mab CD3 яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Предпочтительно гэп яванского макака/человека находится в одинаковом диапазоне для анти-ВСМА и анти-CD3 антитела.

Термин «APRIL», используемый в данном документе, относится к рекомбинантному, усеченному мышинному APRIL (аминокислоты 106–241; NP_076006). APRIL можно получать, как описано в Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009–18).

Термин «BAFF», используемый в данном документе, относится к рекомбинантному, усеченному человеческому BAFF (UniProt Q9Y275 (TN13B_HUMAN), который можно получать как описано в Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Предпочтительно, в соответствии с данным изобретением используется His-маркированный BAFF. Предпочтительно, His-маркированный BAFF получают клонированием ДНК-фрагмента, кодирующего остатки BAFF 82–285 в экспрессионном векторе, создавая слияние с N-концевым His-маркером с последующим сайтом расщепления тромбином, экспрессией указанного вектора и расщеплением выделенного белка тромбином.

Анти-ВСМА антитела анализируют методом ELISA на связывание с ВСМА человека с использованием связанного с планшетом ВСМА. Для этого анализа количество связанного с планшетом ВСМА

предпочтительно составляет 1,5 $\mu\text{г}/\text{мл}$ и концентрация (-и) находятся в диапазоне от 0,1 пМ до 200 нМ используемого анти-BCMA антитела.

Термин «NF- κB », используемый в данном документе, относится к рекомбинантному NF- κB p50, номер доступа (P19838). Активность NF- κB можно измерять путем ДНК-связывания методом ELISA экстракта клеток MM NCI-H929 (CRL-9068TM). Клетки MM NCI-H929, необработанные или обработанные 0,1 мкг/мл TNF- α , 1000 нг/мл обработанного нагреванием HT-усеченного-BAFF, 1000 нг/мл усеченного-BAFF, от 0,1 пМ до 200 нМ изотипного контроля и с или без от 0,1 пМ до 200 нМ анти-BCMA антител инкубировали в течение 20 мин. Активность NF- κB можно анализировать с использованием функционального ELISA, который выявляет хемилюминесцентный сигнал от p65, связанного с консенсусной последовательностью NF- κB (US6150090).

В данном документе термин «дополнительная мишень» используется в значении предпочтительно CD3 ϵ . Термин «первая мишень и вторая мишень» означает либо CD3 в качестве первой мишени и BCMA в качестве второй мишени, либо означает BCMA в качестве первой мишени и CD3 в качестве второй мишени.

Термин «CD3 ϵ или CD3», используемый в данном документе, относится к CD3 ϵ человека, описанном под кодом UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин «антитело против CD3 ϵ , анти-CD3 ϵ антитело» относится к антителу, специфически связывающемуся с CD3 ϵ . В одном варианте реализации изобретения антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи и переменный домен VL, содержащий CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит переменные домены SEQ ID NO:7 (VH) и SEQ ID NO:8 (VL).

Термин «антитело», используемый в данном документе, относится к моноклональному антителу. Антитело состоит из двух пар «легкой цепи» (LC) и «тяжелой цепи» (HC) (такие пары легкой цепи (LC) /тяжелой цепи сокращены в данном документе как LC/HC). Легкие цепи и тяжелые цепи таких антител представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких доменов. Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенно обозначен в данном документе как HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит константные домены CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи (классы антител IgA, IgD и IgG) и необязательно константный домен CH4 тяжелой цепи (классы антител IgE и IgM). Каждая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи VL и константный домен CL легкой цепи. Переменные домены VH и VL можно дополнительно разделять на участки гипервариабельности, называемые определяющими

комплементарность участками (CDR), разделенные более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Константные домены» тяжелой цепи и легкой цепи не принимают непосредственного участия в связывании антитела с мишенью, однако проявляют различные эффекторные функции. Термин «антитело», используемый в данном документе, относится также части антитела, которая требуется по меньшей мере для специфического связывания с антигеном CD3, соответствующего ВСМА. Поэтому такое антитело (или часть антитела) в одном варианте реализации изобретения может представлять собой Fab-фрагмент, если указанная часть антитела содержится в биспецифическом антителе в соответствии с изобретением. Антитело в соответствии с изобретением также может представлять собой Fab', F(ab')₂, scFv, ди-scFv или привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BiTE).

Термин «антитело» включает, например, антитело мыши, антитело человека, химерное антитело, гуманизированное антитело и генетически сконструированные антитела (вариантные или мутантные антитела), при условии сохранения их характерных свойств. Особенно предпочтительными являются человеческие или гуманизированные антитела, особенно в виде рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител. В дополнительных вариантах реализации изобретения представлены гетероспецифические антитела (биспецифические, триспецифические и т. п.) и другие конъюгаты, например с цитотоксическими малыми молекулами.

Термин «биспецифическое антитело», используемый в данном документе, в одном варианте реализации изобретения относится к антителу, в котором одна из двух частей тяжелой цепи и легкой цепи (НС/LC) специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с ВСМА. Данный термин также относится к другим формам биспецифических антител, в соответствии с состоянием техники, в одном варианте реализации изобретения – к биспецифическим одноцепочечным антителам.

Термин «ТСВ», используемый в данном документе, относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с ВСМА и CD3. Термин «83A10-ТСВ_{CV}», используемый в данном документе относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с ВСМА и CD3, как определено комбинацией его тяжелых и легких цепей с SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 (2x) и SEQ ID NO:48, и как показано на Фиг. 2А и описано в EP14179705. Термины «21-ТСВ_{CV}, 22-ТСВ_{CV}, 42-ТСВ_{CV}», используемые в данном документе, относятся к соответствующим биспецифическим антителам Mab21, как определено комбинацией их тяжелых и легких цепей с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51 (2x), Mab 22, как определено комбинацией их тяжелых и легких цепей с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:54 (2x), и Mab42,

как определено комбинацией их тяжелых и легких цепей с SEQ ID NO:48 и SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57-(2x).

Термин «голое антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, которое специфически связывается с ВСМА, содержит Fc-часть и не конъюгировано с терапевтическим средством, например с цитотоксическим средством или радиоактивной меткой. Термин «конъюгированное антитело, конъюгат с лекарственным средством», используемый в данном документе, относится к антителу, которое специфически связывается с ВСМА и конъюгировано с терапевтическим средством, например с цитотоксическим средством или радиоактивной меткой.

Термин «биспецифическое одноцепочечное антитело», используемый в данном документе, относится к одной цепи полипептида, содержащей в одном варианте реализации изобретения два связывающих домена, один – специфически связывается с ВСМА, а другой в одном варианте реализации – специфически связывается с CD3. Каждый связывающий домен содержит один переменный участок из тяжелой цепи антитела (VH-участок), отличающийся тем, что данный VH-участок первого связывающего домена специфически связывается с молекулой CD3, а VH-участок второго связывающего домена специфически связывается с ВСМА. Два связывающих домена необязательно соединены друг с другом коротким полипептидным спейсером. Неограничивающий пример полипептидного спейсера представляет собой Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) и его повторы. Каждый связывающий домен может дополнительно содержать один переменный участок из легкой цепи антитела (VL-участок), VH-участок и VL-участок в пределах каждого из первого и второго связывающих доменов, соединенных друг с другом посредством полипептидного линкера, достаточно длинные для обеспечения спаривания VH-участка и VL-участка первого связывающего домена и VH-участка и VL-участка второго связывающего домена друг с другом так, чтобы вместе они были способны специфически связываться с соответствующим первым и вторым связывающими доменами (см. например EP0623679). Биспецифические одноцепочечные антитела также упоминаются, например, в Choi BD et al., *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Jul;11(7):843-53 и Wolf E. et al., *Drug Discov Today.* 2005 Sep 15;10(18):1237-44.

Термин «диатело», используемый в данном документе относится к небольшому бивалентному и биспецифическому фрагменту антитела, содержащему переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) на той же полипептидной цепи (VH- VL), соединенные линкером, который является слишком коротким для образования пары из двух доменов на одной и той же цепи (Kipriyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772). Это вызывает спаривание с комплементарными доменами другой цепи и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антигенсвязывающими сайтами. Для конструирования биспецифических диател по

данному изобретению, сливают V-домены анти-CD3 антитела и анти-BCMA антитела для создания двух цепей VH(CD3)-VL(BCMA), VH(BCMA)-VL(CD3). Каждая цепь сама по себе не способна связываться с соответствующим антигеном, но воссоздаст функциональные антигенсвязывающие сайты анти-CD3 антитела и анти-BCMA антитела при спаривании с другой цепью. Две молекулы scFv с линкером между переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи, который слишком короткий для внутримолекулярной димеризации, совместно экспрессируются и самостоятельно собираются с образованием биспецифических молекул с двумя связывающими сайтами на противоположных концах. В качестве примера, переменные участки, кодирующие связывающие домены для BCMA и CD3, соответственно, можно амплифицировать методом ПЦР из ДНК-конструкций, полученных согласно описанию, таким образом, чтобы их можно было клонировать в векторе, например pNOG, как описано в Kipriyanov et al., J. Immunol, Methods, 200, 69-77 (1997a). Две scFV-конструкции затем комбинируют в один экспрессионный вектор в требуемой ориентации, благодаря которой линкер VH-VL сокращен для предотвращения обратного сворачивания этих цепей на самих себя. ДНК-сегменты разделены стоп-кодоном и сайтом связывания рибосом (RBS). RBS обеспечивает транскрипцию мРНК в качестве бицистронной матрицы, которая транслируется рибосомами в два белка, которые нековалентно взаимодействуют с образованием молекулы диатела. Диатела, как и фрагменты других антител, обладают преимуществом в том, что они могут экспрессироваться в бактериях (*E. coli*) и дрожжевой клетке (*Pichia pastoris*) в функциональной форме и с высокими выходами (до Ig/л).

Термин «тандемные scFV», используемый в данном документе, относится к одноцепочечной Fv-молекуле (т. е. молекуле, образованной путем связывания переменных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов, VH и VL, соответственно), как описано, например, в WO 03/025018 и WO 03/048209. Такие Fv-молекулы, которые известны как TandAb®, содержат четыре переменных доменов антител, причем (i) либо первые два, либо последние два из четырех переменных доменов связываются внутримолекулярно друг с другом в пределах одной и той же цепи путем образования антигенсвязывающего scFv в ориентации VH/VL или VL/VH, (ii) другие два домена связываются внутримолекулярно с соответствующими VH- или VL-доменами другой цепи с образованием антигенсвязывающих пар VH/VL. В предпочтительном варианте реализации изобретения, как упомянуто в WO 03/025018, мономеры такой Fv-молекулы содержат по меньшей мере четыре переменных доменов, из которых два соседних домена одной мономера образуют антигенсвязывающую VH-VL или VL-VH scFv-единицу.

Термин «DARPin», используемый в данном документе, относится к биспецифической молекуле с анкириновым повтором, как описано в US 2009082274. Эти молекулы происходят из природных анкириновых белков, которые могут обнаруживаться в геноме человека и представляют собой один из

наиболее распространенных типов связывающих белков. Модуль библиотеки DARPIn определяется последовательностями белков с анкириновым повтором, с использованием 229 анкириновых повторов для первоначальной конструкции и другими 2200 для последующего совершенствования. Модули служат строительными блоками для библиотек DARPIn. Модули библиотек напоминают последовательности человеческого генома. DARPIn состоит из от 4 до 6 модулей. Поскольку каждый модуль составляет приблизительно 3,5 кДа, то размер среднего DARPIn составляет 16-21 кДа. Выбор связывающих антител выполняется методом рибосомного дисплея, который является полностью бесклеточным и описан в He M and Taussig MJ., *Biochem Soc Trans.* 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

Термин «привлекающий Т-клеток биспецифический активатор» касается слитых белков, состоящих из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) различных антител, или аминокислотных последовательностей из четырех различных генов, на одной пептидной цепи размером около 55 килоДальтон. Один из scFv связывается с Т-клетками посредством рецептора CD3, а другой с ВСМА.

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

Каждая тяжелая цепь имеет два участка, константный участок и переменный участок. Константный участок идентичен во всех антителах того же изотипа, но отличается у антител разных изотипов. Тяжелые цепи γ , α и δ содержат константный участок, состоящий из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (в ряд) и шарнирный участок для дополнительной гибкости Woof J, Burton D *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 89-99); тяжелые цепи μ и ϵ содержат константный участок, состоящий из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway CA, Jr et al (2001). *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing). Переменный участок тяжелой цепи отличается в антителах, образованных разными В-клетками, но являются одинаковыми для всех антител, образованных одной В-клеткой или клоном В-клеток. Переменный участок каждой тяжелой цепи содержит в длину приблизительно 110 аминокислот и состоит из одного домена антитела.

У млекопитающих существует только два типа легкой цепи, которая называется лямбда (λ) и каппа (κ). Легкая цепь имеет два последовательных домена: один константный домен CL и один переменный домен VL. Приблизительная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа (κ), а константный

домен CL, в одном варианте реализации изобретения, походит от легкой цепи каппа (K) (константный домен СК).

Термин «ак-замена», используемый в данном документе, относится к независимой аминокислотной замене в константном домене СН1 по аминокислоте в положениях 147 и 213 на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), а в константном домене CL аминокислота в положении 124 заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). В одном варианте реализации изобретения дополнительно в константном домене CL аминокислота в положении 123 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). В одном варианте реализации изобретения аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. Ак-замены производятся либо в CD3 Fab, либо в одном или двух ВСМА Fab. Биспецифические антитела против ВСМА и CD3, как варианты с другим зарядом, описаны в EP14179705, описанные для примера (дополнительно называемые как «заряженные варианты, что соответствует замене заряженного варианта»).

Нумерация всех аминокислот в данном документе выполнена согласно Кабату (Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242).

Термины «моноклональное антитело» или «композиция моноклональных антител», используемая в данном документе, относится к препарату из молекул антител с одним аминокислотным составом.

Термин «антитела», в соответствии с изобретением, может касаться любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG или IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1), причем как антитела, из которых походит бивалентное биспецифическое антитело в соответствии с изобретением, имеет Fc-часть того же подкласса (например, IgG1, IgG4 и т. п., предпочтительно IgG1), предпочтительно того же аллотипа (например, европеоидного).

«Fc-часть антитела» представляет собой термин, хорошо известный специалисту и определен на основе расщепления антител папаином. Антитела в соответствии с изобретением содержат в качестве Fc-части, в одном варианте реализации изобретения, Fc-часть человеческого происхождения и предпочтительно все другие части константных участков человека. Fc-часть антитела непосредственно вовлечена в активацию комплемента, связывание C1q, активацию C3 и связывание Fc-рецептора. Поскольку влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, то связывание с C1q вызвано определенными сайтами связывания в Fc-части. Такие сайты связывания известны в данном состоянии техники и описаны, например, Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse,

R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324 и EP 0 307 434.

Такие сайты связывания представлены, например L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). Антитела подкласса IgG1, IgG2 и IgG3 обычно показывают активацию комплемента, связывание C1q и активацию C3, тогда как IgG4 не активирует систему комплемента, не связывает C1q и не активирует C3. В одном варианте реализации изобретения Fc-часть представляет собой Fc-часть человека.

В одном варианте реализации изобретения антитело, в соответствии с изобретением, содержит Fc-вариант дикого типа Fc-участка IgG человека, указанный Fc-вариант содержит аминокислотную замену в положении Pro329 и по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену, причем остатки нумеруются в соответствии с EU-индексом по Кабату и при этом указанное антитело проявляет пониженную аффинность к FcγRIIIA и/или FcγRIIA и/или FcγRI человека по сравнению с антителом, содержащим Fc-участок IgG дикого типа, и при этом АЗКЦ, индуцированное указанным антителом снижено по меньшей мере на 20 % от АЗКЦ, индуцированной антителом, включающим человеческий Fc-участок IgG дикого типа. В конкретном варианте реализации изобретения Pro329 человеческого Fc-участка дикого человека типа заменяется на глицин или аргинин, или аминокислотный остаток достаточно большой, чтобы разрушить пролиновый сэндвич в пределах поверхности взаимодействия Fc/Fcγ-рецепторов, который образуется между пролином 329 Fc и триптофановыми остатками W87 и W110 FcγRIII (Sondermann et al.: *Nature* 406, 267-273 (20 July 2000)). В дополнительном аспекте изобретения по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена в Fc-варианте представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S, а еще в одном варианте реализации изобретения указана по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена, представляющая собой L234A и L235A Fc-участка IgG1 человека или S228P и L235E Fc-участка IgG4 человека. Такие Fc-варианты подробно описаны в WO2012130831.

Термином «эффекторная функция», используемым в данном документе, обозначают биохимическое событие, которые приводит к взаимодействию Fc-участка антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают, но не ограничиваются ими, АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ. Термином «эффекторная клетка», используемым в данном документе, обозначают клетку иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредуют одну или более эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, но не ограничиваются ими, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, В-клетки, большие гранулярные

лимфоциты, клетки Лангерганса, клетки-естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ Т-клетки, и их можно получать из организма, включая, но не ограничиваясь, людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Термином «библиотека» в данном документе обозначают ряд Fc-вариантов в любой форме, включающей, но ограничивающейся ими, перечень нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, перечень нуклеотидных или аминокислотных замен в переменных положениях, материальную библиотеку, содержащую нуклеиновые кислоты, которые кодируют библиотеку последовательностей, или материальную библиотеку, содержащую белки Fc-вариантов либо в очищенной, либо в неочищенной форме.

Термином «Fc-гамма рецептор» или «Fc γ R», используемым в данном документе, обозначают любого представителя семейства белков, который связывает Fc-участок IgG-антитела и в основном кодируется генами Fc γ R. У людей это семейство включает, но не ограничивается Fc γ RI (CD64), включая изоформы Fc γ RIa, Fc γ RIb и Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), включая изоформы Fc γ RIIa (включая аллотипы H131 и R131), Fc γ RIIb (включая Fc γ RIIb-1 и Fc γ RIIb-2) и Fc γ RIIc; и Fc γ RIII (CD16), включая изоформы Fc γ RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc γ RIIIb (включая аллотипы Fc γ RIIIb-NA1 и Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65), а также любые неоткрытые человеческие изоформы или аллотипы Fc γ R или Fc γ R. Fc γ R могут быть получены из любого организма, включая, но ограничиваясь, людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Fc γ R мыши включают, но не ограничиваются ими, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) и Fc γ RIII-2 (CD16-2), а также любыми неоткрытыми мышными Fc γ R или изоформами, или аллотипами Fc γ R.

Термин «Fc-вариант с увеличенной эффекторной функцией», используемый в данном документе, обозначает Fc-последовательность, которая отличается от такой последовательности исходной Fc-последовательности благодаря по меньшей мере одной аминокислотной модификации, или относится к другим модификациям, сходным с изменением гликозилирования, например, в Asn279, которая увеличивает эффекторные функции. Такие модификации, например, упомянуты, в Duncan et al., 1988, *Nature* 332:563-564; Lund et al., 1991, *J Immunol* 147:2657-2662; Lund et al., 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre et al., 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, *Immunol Lett* 44:111-117; Lund et al., 1995, *Faseb J* 9:115-119; Jefferis et al., 1996, *Immunol Lett* 54:101-104; Lund et al., 1996, *J Immunol* 157:4963-4969; Armour et al., 1999, *Eur J Immunol* 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, *J Immunol* 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, *J Immunol* 164:1925-1933; Xu et al., 2000, *Cell Immunol* 200:16-26; Idusogie et al., 2001, *J Immunol* 166:2571-2575; Shields et al., 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; Presta et al., 2002, *Biochem Soc Trans* 30:487-490; US5624821; US5885573; US6194551; WO200042072; WO199958572. Такие Fc-модификации также включают, в соответствии с изобретением, сконструированные гликоформы Fc-части. Термином «сконструированная гликоформа», используемым в данном

документе, обозначают углеводную композицию, которая ковалентно присоединена с Fc-полипептидом, причем указанная углеводная композиция отличается химически от такой композиции исходного Fc-полипептида. Сконструированные гликоформы можно получать любым способом, например, использованием сконструированных или вариантных экспрессионных штаммов, путем совместной экспрессии с одним или более ферментами, например, D1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII), путем экспрессии Fc-полипептида в различных организмах или линиях клеток из различных организмов, или модификацией углевода (-ов) после экспрессии Fc-полипептида. Способы для получения сконструированных гликоформ известны в данной области техники и упомянуты в Umana et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473) US6602684; WO200061739; WO200129246; WO200231140; WO200230954; Potelligent™ technology (Biowa, Inc., г. Принстон, штат Нью-Джерси); GlycoMAb™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, г. Цюрих, Швейцария)). Сконструированная гликоформа, как правило, относится к отличающейся углеводной или олигосахаридной композиции, от исходного Fc-полипептида.

Антитела в соответствии с изобретением, содержащие Fc-вариант с увеличенной эффекторной функцией, показывают высокую аффинность связывания с Fc-гамма рецептором III (FcγRIII, CD 16a). Высокая аффинность связывания с FcγRIII отмечается в том, что связывание для CD16a/F158 усиливается по меньшей мере 10-кратно по отношению к исходному антителу (95 % фукозилирования), как эталон экспрессирующемся в клетках-хозяевах CHO, таких как CHO DG44 или CHO K1-клетки, или/и связывание с CD16a/V158 усиливается по меньшей мере 20-кратно по отношению к исходному антителу, измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием иммобилизованного CD 16a при концентрации антитела 100 нМ. Связывание FcγRIII можно увеличивать способами в соответствии с состоянием техники, например, путем модификации аминокислотной последовательности Fc-части или гликозилирования Fc-части антитела (см. например EP2235061). Mori, K et al., *Cytotechnology* 55 (2007)109 и Satoh M, et al., *Expert Opin Biol Ther.* 6 (2006) 1161-1173 касаются нокаутной линии CHO по FUT8 (α -1,6-фукозилтрансфераза) для получения афукозилированных антител.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, содержащему вариabельный участок, т. е. участок связывания, от одного источника или вида и по меньшей мере часть константного участка, происходящую от другого источника или вида, обычно полученного методами рекомбинантных ДНК. Предпочтительны химерные антитела, содержащие мышинный вариabельный участок и человеческий константный участок. Другие предпочтительные формы «химерных антител», охватываемые настоящим изобретением, включают те, у которых был модифицирован или изменен константный

участок, по сравнению с таким участком оригинального антитела для получения свойств в соответствии с изобретением, особенно в отношении связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела также называются «антителами с переключенным классом». Химерные антитела представляют собой продукт экспрессии иммуноглобулиновых генов, содержащих ДНК-сегменты, кодирующие иммуноглобулиновые переменные участки и ДНК-сегменты, кодирующие иммуноглобулиновые константные участки. Способы получения химерных антител включают традиционные методики трансфекции рекомбинантных ДНК и генов, хорошо известные в данной области техники. См., например, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США № 5202238 и 5204244.

Термин «гуманизованное антитело» относится к антителам, у которых каркас или «определяющие комплементарность участки» (CDR) были модифицированы с целью включения CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению с такими участками исходного иммуноглобулина. В предпочтительном варианте реализации изобретения мышиное CDR привито на каркасный участок человеческого антитела для получения «гуманизованного антитела». См., например, Riechmann, L., et al., Nature 322 (1988) 323-327 и Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Другие формы «гуманизованных антител», охватываемые настоящим изобретением, включают те, у которых был дополнительно модифицирован или изменен константный участок, по сравнению с таким участком оригинального антитела для получения свойств в соответствии с изобретением, особенно в отношении связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, подразумевает включение антитела, содержащие переменные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человеческой эмбриональной линии. Антитела человека хорошо известны в данном состоянии техники (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Антитела человека также могут продуцироваться у трансгенных животных (например, мышей), которые способны, при иммунизации, продуцировать полный репертуар или подборку антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов эмбриональной линии человека в таких мутантных по эмбриональной линии мышей должен приводить к продукции антител человека (см., например, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Антитела человека также могут продуцироваться в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Методики Cole et al. и Boerner et al., также доступны для получения моноклональных антител человека (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); и Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Как уже упоминалось в отношении

химерных и гуманизированных антител в соответствии с изобретением, термин «антитело человека», используемый в данном документе, также содержит такие антитела, которые модифицированы в константном участке, для получения свойств в соответствии с изобретением, особенно в отношении связывания C1q и/или связывания FcR, например путем «переключения класса», т. е. изменение или мутация Fc-частей (например, из IgG1 в IgG4 и/или мутация IgG1/IgG4).

Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в данном документе, подразумевает включение всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как клетка NSO или CHO, или из организма животного (например, мыши), являющегося трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области в перестроенной форме. Рекомбинантные антитела человека в соответствии с изобретением подвергли соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-участков рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, когда получены из и родственных последовательностей VH и VL эмбриональной линии человека, не могут естественным образом существовать в пределах репертуара эмбриональной линии антител человека *in vivo*.

Термин «переменный домен» (переменный домен легкой цепи (VL), переменный домен тяжелой цепи (VH)), используемый в данном документе, отмечает каждую из пары легкой и тяжелой цепей, которые непосредственно вовлечены в связывание антитела в соответствии с изобретением. Домены переменной легкой и тяжелой цепей человека имеют одинаковую общую структуру и каждый домен содержит четыре каркасных (FR) участка, последовательности которых являются консервативными в широком спектре видов и соединены тремя «гиперпеременными участками» (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки принимают конформацию β -листа, а CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру β -листа. CDR в каждой цепи удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными участками и образуют вместе с CDR из другой цепи сайт связывания. CDR3-участки тяжелой и легкой цепи антитела играют особенно важную роль в проявлении специфичности/аффинности связывания антител в соответствии с изобретением и, поэтому, обеспечивают дополнительный предмет изобретения.

Термины «гиперпеременный участок» или «связывающая мишень часть антитела», если используется в данном документе, относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание мишени. Гиперпеременный участок содержит аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность участков» или CDR. Остатки «каркасных» или FR-участков представляют собой

остатки участков переменных доменов, отличающиеся от определяемых в данном документе остатков гиперпеременных участков. Поэтому легкие и тяжелые цепи антитела содержат от N-конца к C-концу содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на каждой цепи разделены такими каркасными аминокислотами. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляет собой участок, который в наибольшей степени участвует в связывании мишени. CDR- и FR-участки определены в соответствии со стандартным определением по Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Термины «CDR1H, CDR2H и CDR3H», используемые в данном документе, относятся к соответствующим CDR тяжелой цепи, расположенной в переменном домене VH. Термины «CDR1L, CDR2L и CDR3L», используемые в данном документе, относятся к соответствующим CDR легкой цепи, расположенной в переменном домене VL.

Константный домен тяжелой цепи CH1, которым заменяют домен тяжелой цепи CH3, может происходить из любого класса Ig (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Константный домен легкой цепи CL, которым заменяют домен тяжелой цепи CH3, может представлять тип лямбда (λ) или каппа (κ), предпочтительно тип каппа (κ).

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

Термин «эпитоп» включает любую антигенную детерминанту, способную к специфическому связыванию с антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах реализации изобретения могут обладать конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными зарядовыми характеристиками. Эпитоп представляет собой участок мишени, который связывается антителом.

В общем, существует два вектора, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь антитела в соответствии с изобретением. В отношении биспецифического антитела существуют два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающегося с первой мишенью, и дополнительные два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающегося со второй мишенью. Один из двух векторов кодирует соответствующую легкую цепь, а другой из двух векторов кодирует соответствующую тяжелую цепь.

Однако, в альтернативном способе получения антитела в соответствии с изобретением, для трансформации клетки-хозяина может использоваться только один первый вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первой мишенью, и только один второй вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со второй мишенью.

Термин «нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты», используемый в данном документе, предназначен для включения ДНК-молекул и РНК-молекул. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно двухцепочечной ДНК.

Используемые в данном документе выражения «клетка», «клеточная линия» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают в себя первичную клетку-субъект и культуры, полученные из нее, без учета количества пассажей. Также понятно, что все потомство не может быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. В объем настоящего описания входит вариант потомства, полученный путем скрининга, который обладает такой же функцией или биологической активностью, что и исходно трансформированная клетка. Если предусмотрены разные обозначения, это будет ясно из контекста.

Термин «трансформация», используемый в данном документе, относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев используются клетки без труднопреодолимых барьеров клеточной стенки, то трансфекцию выполняют, например, методом преципитации фосфата кальция, как описано Graham and Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Однако для введения ДНК в клетки можно применять другие методы, такие как введение ядер или слияние протопластов. Если используют прокариотические клетки или клетки, которые содержат существенные конструкции клеточной стенки, то применяют, например, один метод трансфекции с использованием хлорида кальция, как описано Cohen SN, et al, *PNAS* 1972, 69 (8): 2110-2114.

Рекомбинантная продукция антител с использованием трансформации хорошо известна в данном состоянии техники и описана, например, в обзоре статей Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880, а также в US6331415 и US4816567.

Используемый в данном документе термин «экспрессия» относится к процессу, с помощью которого нуклеиновая кислота транскрибируется в мРНК, и/или к процессу, с помощью которого транскрибированная мРНК (также называемая транскрипт) впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодированные полипептиды совокупно называются генными

продуктами. Если полинуклеотиды происходят из геномной ДНК, экспрессия в эукариотических клетках может включать сплайсинг мРНК.

«Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит молекулу нуклеиновой кислоты со вставкой в и/или между клетками-хозяевами. Данный термин включает векторы, которые главным образом функционируют для вставки ДНК или РНК в клетку (например, хромосомная интеграция), репликация векторов, которые главным образом функционируют для репликации ДНК или РНК, и экспрессионные векторы, которые функционируют для транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. В него также включены векторы, которые обеспечивают более одной из описанных функций.

«Экспрессионный вектор» представляет собой полинуклеотид, который при введении в подходящую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. «Система экспрессии» обычно относится к подходящей клетке-хозяину, содержащей экспрессионный вектор, который может функционировать с образованием требуемого экспрессионного продукта.

Антитела в соответствии с изобретением предпочтительно продуцируются рекомбинантными способами. Такие способы широко известны при данном состоянии техники и охватывают экспрессию белков в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и обычно очистки до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белков, нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, вставляют в экспрессионный вектор стандартными методами. Экспрессию выполняют в подходящих прокариотических или эукариотических клетках, таких как клетки CHO, клетки NSO, клетки SP2/0, клетки HEK293, клетки COS, дрожжевые клетки и клетки *E. coli*, и антитело выделяют из клеток (супернатант или клетки после лизиса). Биспецифические антитела могут присутствовать в целых клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или в основном чистой форме. Очистку выполняют с целью удаления других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методиками, включающими обработку щелочью/ДДС, колоночную хроматографию и другие хорошо известные в данной области техники методики. См. Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Экспрессия в клетках NSO описана, например, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; и Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Транзиентная экспрессия описана, например, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Клонирование переменных доменов описано Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89

(1992) 4285-4289; и Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Предпочтительная транзиентная система экспрессии (НЕК293) описана Schlaeger, E.- J., and Christensen, K., в *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 и Schlaeger, E.-J., в *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Контрольные последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательную операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Антитела соответственным образом отделяют от культуральной среды с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, применение белка А-сефарозы, гидроксилпатитовая хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК или РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют, используя традиционные способы. Клетки гибридомы могут служить источником такой ДНК и РНК. Для обеспечения синтеза рекомбинантных моноклональных антител в таких клетках-хозяевах после выделения ДНК можно вводить в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки НЕК293, клетки СНО или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют иммуноглобулиновый белок.

Варианты (или мутанты) аминокислотных последовательностей антитела в соответствии с изобретением получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела, или путем нуклеотидного синтеза. Однако такие модификации можно выполнять только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не изменяют упомянутые выше характеристики антитела, такие как изотип IgG и связывание мишени, но могут улучшать выход рекомбинантной продукции, стабильность белка или облегчать очистку.

В одном варианте реализации в изобретении предложены выделенная или очищенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит фрагмент распознавания антигена, направленный против ВСМА, трансмембранный фрагмент и фрагмент активации Т-клеток, для которых характерно, что фрагмент распознавания антигена представляет собой антитело в соответствии с изобретением (здесь не имеется ввиду биспецифическое антитело). Кодированное антитело также может представлять собой его описанный антигенсвязывающий фрагмент. Структуры и получение таких «ВСМА CAR» описаны, например, в WO2013154760, WO2015052538, WO2015090229 и WO2015092024.

В одном варианте реализации в изобретение представлен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

- (i) фрагмент распознавания антигена созревания В-клеток (ВСМА);

- (i) спейсерный домен и
- (ii) трансмембранный домен, и
- (iii) внутриклеточный домен передачи сигнала Т-клеток,

характеризующийся тем, что фрагмент распознавания ВСМА представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с ВСМА, характеризующееся наличием CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

Фрагмент активации Т-клеток может быть подходящим фрагментом, происходящим или полученным из любой подходящей молекулы. В одном варианте реализации изобретения, например, фрагмент активации Т-клеток содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен может быть любым трансмембранным доменом, происходящим или полученным из любой молекулы, известной в данной области техники. Например, трансмембранный домен можно получать или он может происходить из CD8 α -молекулы или CD28-молекул. CD8 представляет собой трансмембранный гликопротеин, служащий корцептором Т-клеточного рецептора (TCR) и экспрессирующийся главным образом на поверхности цитотоксических Т-клеток. Наиболее общая форма CD8 существует в виде димера, состоящего из цепи CD8-альфа и CD8-бета. CD28 экспрессируется на Т-клетках и обеспечивает костимулирующие сигналы, требуемые для активации Т-клеток. CD28 представляет собой рецептор для CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2). В предпочтительном варианте реализации изобретения CD8-альфа и

CD28 являются человеческими. В дополнение к этому трансмембранный домен, фрагмент активации Т-клеток дополнительно содержит внутриклеточный (т. е. цитоплазматический) домен передачи сигнала Т-клеток. Внутриклеточный домен передачи сигнала Т-клеток можно получать или он может происходить из CD28-молекулы, CD3-дзета молекулы или их модифицированных вариантов, цепи рецептора Fc-гамма (Fc γ), CD27-молекулы, OX40-молекулы, 4-1BB-молекулы или других внутриклеточных молекул сигналинга, известных в данной области техники. Как обсуждалось выше, CD28 представляет собой маркер Т-клеток, важный для костимуляции Т-клеток. CD3-дзета ассоциируется с TCR для продуцирования сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). 4-1BB, также известный как CD137, передает сильный костимулирующий сигнал Т-клеткам, способствуя дифференцировке и усилению долговременного выживания Т-лимфоцитов. В одном варианте реализации изобретения CD28, CD3-дзета, 4-1BB, OX40 и CD27 являются человеческими.

В изобретении в одном варианте реализации предложена выделенная или очищенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), указанный выше.

Биспецифические связывающие Т-клетки антитела (ТСВ) обладают очень высокой зависимой от концентрации/занятости рецепторов опухолевых клеток активностью при уничтожении клеток (например, EC₅₀ при анализах с уничтожением клеток *in vitro* в субнизком или низком пиколярном диапазоне; Dreier et al. Int J Cancer 2002). Биспецифические связывающие Т-клетки антитела (ТСВ) назначают в намного более низких дозах, чем традиционные моноспецифические антитела. Например, блинатумораб (CD19хCD3) назначается в виде непрерывного внутривенного дозирования от 5 до 15 мкг/м²/сутки (т. е. всего лишь от 0,35 до 0,105 мг/м²/неделю) для лечения острого лимфоцитарного лейкоза или 60 мкг/м²/сутки для лечения неходжкинской лимфомы, и сывороточные концентрации при таких дозах находятся в диапазоне от 0,5 до 4 нг/мл (Klinger et al., Blood 2012; Topp et al., J Clin Oncol 2011; Goebeler et al. Ann Oncol 2011). Поскольку низкие дозы ТСВ могут проявлять высокую активность у пациентов, то предусмотрено, что для антитела в соответствии с изобретением возможно и в условиях клиники предпочтительно подкожное введение (предпочтительно в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно 25 мг/м²/неделю, предпочтительно 250 мг/м²/неделю). Даже при этих низких концентрациях/дозах/занятости рецепторов, ТСВ могут вызывать существенные нежелательные явления (Klinger et al., Blood 2012). Поэтому критически важным является контроль занятости/охвата опухолевых клеток. У пациентов с высокими и переменными уровнями сывороточных APRIL и BAFF (например, пациенты с множественной миеломой, Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157) ряд ТСВ, связанных с опухолевыми клетками, соответствующих занятости опухолевых клеток, могут существенно повергаться влиянию APRIL/BAFF. Но кроме использования указанного антитела по

этому изобретению, может не требоваться нужная занятость опухолевых клеток для соответствующей эффективности/безопасности для увеличения дозы антитела в соответствии с изобретением, так как указанное антитело может не подвергаться конкуренции с лигандами APRIL/BAFF. Другое преимущество антитела в соответствии с изобретением основано на включении Fc -части, которая увеличивает период полувыведения от около 4 до 12 суток и позволяет проводить введения по меньшей мере один или два раза в неделю по сравнению с TCB без Fc-части (например, блинатумомаб), которые требуются для внутривенного или постоянного введения с помощью насоса, носимого пациентами.

Биологические свойства антител в соответствии с изобретением, соответствующие анти-BCMA/анти-CD3 антителам TCB, были изучены в нескольких исследованиях по сравнению с 83A10-TCB_{scv}. Активность в отношении индукции перенаправленной Т-клетками цитотоксичности, например, анти-BCMA/анти-CD3 антител 21-TCB_{scv}, 22-TCB_{scv}, 42-TCB_{scv} по сравнению с 83A10-TCB_{scv}, измерены на линии клеток MM H929 (пример 8, табл. 12, Фиг. 4). Исследовали антитела по данному изобретению и анализ показал, что обнаруженная зависимость от концентрации гибель клеток H929, соответствующая значениям EC₅₀, была выше значений EC₅₀, определенных для 83A10-TCB_{scv}; это дает основание предположить, что анти-BCMA антитела в соответствии с изобретением в виде TCB были менее активными для индукции гибели клеток MM H929, чем Mab 83A10 в виде TCB. Неожиданно наблюдалось возвращение, когда перенаправленная Т-клетками цитотоксичность измерялась для линии клеток MM RPMI-8226, а также линии клеток JN-3 (соответственно примеры 10 и 11, табл. 13, 14 и 15, Фиг. 6 и 7): антитела в соответствии с изобретением в виде TCB показали более низкие EC₅₀ и, поэтому, более высокую активность, чем 83A10-TCB_{scv}. К удивлению изобретателей, антитела в соответствии с изобретением, такие как TCB, показали несколько преимуществ при прямом сравнении с 83A10 TCB_{scv} в аспиратах костного мозга, недавно отобранных у пациентов с MM (примечание: наилучшее возможное сравнение, во всех аспиратах костного мозга все биспецифические антитела Т-клеток (TCB) всегда исследовали при одинаковых концентрациях):

- Более высокая активность уничтожения клеток миеломы, т. е. тот же % гибели уже при более низких концентрациях, чем с 83A10-TCB_{scv}, соответственно, кривые зависимости ответа от концентрации для уничтожения сдвинуты влево (пример 13, табл. 18, 19 и 20, Фиг. 8, 9 и 10). Уже при концентрации 1 нМ такие антитела, как TCB в соответствии с изобретением, в аспиратах костного мозга семи различных пациентов обеспечивали снижение относительно контроля по жизнеспособным, негативным по пропидию йодиду, раковым клеткам множественной миеломы между 77,1 и 100 %. Концентрацией 1 нМ 83A10-TCB_{scv} в тех же семи аспиратах костного мозга достигали снижения только на от 37,1 до 98,3 % (табл. 20 и 21).

- Более высокая максимальная гибель по сравнению с 83A10-TCVsv достигалась при максимальной исследованной концентрации (10 нМ) в таком же эксперименте с семью (7) аспиратами костного мозга для таких антител, как TCV, в соответствии с изобретением (табл. 20 и 21).

- Не отвечающие на 83A10-TCVsv пациенты были превращены в отвечающих, если применяли 22-TCVsv/42-TCVsv: В двух (2) образцах костного мозга пациентов, у которых не наблюдали ответа на 83A10-TCVsv в виде гибели клеток, неожиданно была обнаружено уничтожение такими антителами, как TCV в соответствии с изобретением (Фиг. 9A и 9B).

TCV BCMAxCD3 по этому изобретению связываются с BCMA человека и яванских макак (супо) и BCMA мышей и крыс, согласно токсикологическому исследованию на яванских макаках, если CD3-связывающее антитело также связывается с CD3 яванского макака, или на мышах/крысах, если CD3-связывающее антитело также связывается с BCMA мыши/крысы. Неожиданно аффинность связывания с BCMA яванского макака оказывается очень близкой к аффинности связывания с BCMA человека. Для измерения аффинностей связывания с BCMA человека и яванского макака использовали ППР (пример 2, табл. 4). По измеренным данным аффинности рассчитали различие для яванского макака/человека (соотношение аффинностей BCMA яванского макака и человека, KD) путем деления значения аффинности BCMA яванского макака на аффинность BCMA человека (пример 3, табл. 5). Для 83A10 найдено различие для яванского макака/человека равное 15,3 (т. е. аффинность связывания в 15,3 раз ниже для BCMA яванского макака, чем для BCMA человека). К удивлению изобретателей, антитела в соответствии с изобретением показали различия для яванского макака/человека 15,4 и 1,7, которые сходны или в большинстве случаев более благоприятны для различия яванский макак/человек, чем различия для 83A10 (табл. 5). Так как CD3-связывающее антитело, использованное в TCV BCMAxCD3 в соответствии с изобретением, является перекрестнореактивным к CD3 яванского макака, исследования фармакокинетики и фармакодинамики можно выполнять на яванских макаках (см. пример 16). Все токсикологические исследования на яванских макаках дают прогнозируемые результаты по фармакологическим и токсикологическим эффектам для людей, а перекрестная реактивность к признаку яванского макака дает полезный показатель для пациентов. BCMA-антитела по этому изобретению также связываются с мышиным BCMA (например, Kd клонов 22 и 42 измерены методом ППР как 0,9 нМ и 2,5 нМ) см. табл. 2D в примере 1.1.1A.4). CD3-связывающее антитело TCV BCMAxCD3 не является перекрестнореактивным к мышиному CD3.

В заключение, преимущества в отношении активности и эффективности для уничтожения линий клеток, экспрессирующих низкие уровни BCMA, как RPMI-8226 и JLN-3, а особенно для уничтожения клеток MM в аспиратах костного мозга пациентов и, дополнительно, очень благоприятное различие для яванского макака/человека по аффинностям связывания с BCMA делает антитела по этому

изобретению и соответствующие ТСВ особенно перспективными средствами для лечения пациентов с ММ. В дополнение к этому, анти-BCMAxCD3 ТСВ_{сv} по этому изобретению, как и 83A10-ТСВ_{сv}, обладают благоприятными свойствами, как длительный период полувыведения, эффективность при введении один раз в неделю (внутривенно, подкожно), низкая склонность к агрегации или ее отсутствие и возможность изготавливать их с высокой чистотой и хорошим выходом.

Таблица 1А. Последовательности антител

SEQ ID NO:	Название (-я)	ак-последовательностей
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
7	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLVTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNK

	Mab42 VH	NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQ KPGQAPRLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLLAWYQQ KPGQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQ KPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFDY
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLAW

19	83A10 CDR2L	YGASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPPDFT
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLAW
26	Mab22 CDR2L	SGAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLSW
28	Mab42 CDR2L	HSASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L	HASTRAT

	Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAPMGWVR QAPGKGLEWVSAISYIGHTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLVTV SS
39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMGWV RQAPGKGLEWVSAINRFGGSTYYADSVKGRFTISRDNK KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSS
40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNAMGWV RQAPGKGLEWVSAISPTGFSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSS
41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
42	83A10 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

	Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
45	83A10-выступ HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGG GSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	83A10-углубление HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP

		<p>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
47	83A10 LC	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
48	CD3 LC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC</p>
49	Mab21-выступ HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGG GSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE</p>

		AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Mab21-углубление HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQ KPGQAPRLIEHASTRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
52	Mab22-выступ HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGG GSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS

		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Mab22-углубление HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQ KPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	Mab42-выступ HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGG

		<p>GSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
56	Маб42-углубление НС	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWV RQAPGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
57	Маб42 LC	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQ KPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLE PEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

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

Таблица 1В. Последовательности антител (краткий перечень)

	SEQ ID NO:							
CD3-антитело	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
	7	8	1	2	3	4	5	6
BCMA-антитело	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33

Таблица 2А. Дополнительные конструкции

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

Таблица 2В. Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:			
Конструкция	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc-выступ LALA PG (выступ HC)	45	49	52	55
BCMAcv HC-углубление LALA PG (углубление HC)	46	50	53	56
BCMAcv чел. IgG1 LC (BCMA LC)	47	51	54	57

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

Для создания следующих (2+1) Fc-содержащих анти-BCMA/анти-CD3 ТСВ использовали соответствующие ID конструкций / последовательностей, как упомянуто выше в табл. 2В:

83A10-ТСВ_{cv}: 45, 46, 47 (x2), 48 (Фиг. 2А)

21-ТСВ_{cv}: 48, 49, 50, 51 (x2) (Фиг. 2А)

22-ТСВ_{cv}: 48, 52, 53, 54 (x2) (Фиг. 2А)

42-ТСВ_{cv}: 48, 55, 56, 57 (x2) (Фиг. 2А)

В следующих конкретных вариантах реализации изобретения перечислены:

1. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся наличием CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

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

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

г) CDR1H-участка с SEQ ID NO:29 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:30, CDR1L-участка с SEQ ID NO:31 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:32,

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

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

2. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR1H-участок с SEQ ID NO:21, CDR2H-участок с SEQ ID NO:22 и CDR3H-

участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

а) CDR1L-участка с SEQ ID NO:23 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:24,

б) CDR1L-участка с SEQ ID NO:25 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:26 или

с) CDR1L-участка с SEQ ID NO:27 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:28.

3. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 1 или 2, характеризующееся наличием в качестве VL-участка, VL-участок, выбранный из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14.

4. Антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-3, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12.

5. Антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-3, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:13.

6. Антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-3, характеризующееся наличием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:14.

7. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 1 или 2, характеризующееся тем, что аминокислота 49 VL-участка выбрана из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H).

8. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 7, характеризующееся тем, что аминокислота 74 VL-участка представляет собой треонин (T) или аланин (A).

9. Моноклональное антитело специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR1L-участок с SEQ ID NO:31, CDR2L-участок с SEQ ID NO:32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

а) CDR1H-участка с SEQ ID NO:29 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:30,

b) CDR1H-участка с SEQ ID NO:34 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:35, или

c) CDR1H-участка с SEQ ID NO:36 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:37.

10. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 9, характеризующееся наличием VL-участка с SEQ ID NO:12 и VH-участка, выбранного из группы, содержащей VH-участки с SEQ ID NO:38, 39 и 40.

11. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 9 или 10, характеризующееся содержанием аминокислоты 49 VL-участка, выбранной из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H).

12. Антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 9 или 10, характеризующееся тем, что аминокислота 74 VL-участка представляет собой треонин (T) или аланин (A).

13. Антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-12, характеризующееся тем, что оно специфически связывается также с BCMA яванского макака и содержит дополнительный Fab-фрагмент, специфически связывающийся с CD3ε.

14. Антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-13, характеризующееся представлением антитела с Fc или без Fc-части.

15. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с BCMA и CD3ε, характеризующееся наличием CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

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

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

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

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

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

16. Биспецифическое антитело специфически связывающееся с двумя мишенями, которые являются внеклеточным доменом ВСМА человека (дополнительно также называемым ВСМА) и CD3 (дополнительно также называемым CD3), характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR1H-участок с SEQ ID NO:21, CDR2H-участок с SEQ ID NO:22 и CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

а) CDR1L-участка с SEQ ID NO:23 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:24,

б) CDR1L-участка с SEQ ID NO:25 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:26 или

с) CDR1L-участка с SEQ ID NO:27 и CDR2L-участка с SEQ ID NO:28.

17. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 15 или 16, характеризующееся содержанием в качестве VH-участка, VH-участка с SEQ ID NO:10.

18. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-16, характеризующееся тем, что VL ВСМА выбран из группы, состоящей из VL-участков с SEQ ID NO:12, 13 и 14.

19. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 14-18, характеризующееся содержанием в качестве VH-участка ВСМА, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:12, или в качестве VH ВСМА, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:13, или в качестве VH ВСМА, VH-участка с SEQ ID NO:10, и в качестве VL-участка, VL-участка с SEQ ID NO:14.

20. Биспецифическое антитело в соответствии с одним из вариантов реализации изобретения 15 или 19, характеризующееся содержанием аминокислоты 49 VL-участка, выбранной из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H).

21. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-20, характеризующееся тем, что аминокислота 74 VL-участка представляет собой треонин (T) или аланин (A).

22. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с ВСМА и CD3, характеризующееся наличием VH-участка, содержащего CDR3H-участок с SEQ ID NO:17, и VL-участка, содержащего CDR1L-участок с SEQ ID NO:31, CDR2L-участок с SEQ ID NO:32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO:20 и комбинацию CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

a) CDR1H-участка с SEQ ID NO:29 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:30,

b) CDR1H-участка с SEQ ID NO:34 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:35, или

c) CDR1H-участка с SEQ ID NO:36 и CDR2H-участка с SEQ ID NO:37.

23. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 22, характеризующееся наличием VL-участка с SEQ ID NO:12 и VH-участка, выбранного из группы, содержащей VH-участки с SEQ ID NO:38, 39 и 40.

24. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 22 или 23, характеризующееся содержанием аминокислоты 49 VL-участка, выбранной из группы аминокислот: тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H).

25. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 22-24, характеризующееся тем, что аминокислота 74 VL-участка представляет собой треонин (T) или аланин (A).

26. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-25, характеризующееся наличием анти-ВСМА антитела в соответствии с изобретением и анти-CD3 антитела, причем

a) легкая цепь и тяжелая цепь антитела, соответствует любому одному из вариантов реализации изобретения 1-7; и

b) легкая цепь и тяжелая цепь антитела специфически связывается с CD3, при этом переменные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменяют друг друга.

27. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-26, характеризующееся содержанием не более одного Fab-фрагмента части анти-CD3 антитела, не более двух Fab-фрагментов части анти-ВСМА антитела и не более одной Fc-части.

28. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-27, характеризующееся содержанием Fc-части, связанной своим N-концом с C-концом Fab-

фрагмента указанного CD3-антитела и с С-концом одного из указанных Fab-фрагментов ВСМА-антитела.

29. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-28, характеризующееся содержанием второго Fab-фрагмента, указанного анти-ВСМА антитела (часть ВСМА-антитела), связанного своим С-концом с N-концом указанного Fab-фрагмента указанного анти-CD3 антитела (часть CD3-антитела) указанного биспецифического антитела.

30. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом реализации изобретения 29, характеризующееся тем, что VL-домен Fab-фрагмента, указанного анти-CD3 антитела связан с CH1-доменом Fab-фрагмента указанного второго анти-ВСМА антитела.

31. Биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-30, характеризующееся тем, что переменный домен VH части анти-CD3 антитела (дополнительно называемого VH CD3) содержит CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, а переменный домен VL части анти-CD3 антитела (дополнительно называемого VL CD3) содержит CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

32. Биспецифическое антитело, в соответствии с любым из вариантов реализации изобретения 15-31, характеризуется тем, что переменные домены части анти-CD3ε антитела имеют SEQ ID NO:7 и 8.

33. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся наличием

а) первой легкой цепи и первой тяжелой цепи первого антитела, соответствующие любому одному из вариантов реализации изобретения 1-7; и

б) второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и причем переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и

в) при этом в константном домене CL первой легкой цепи по а) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и причем в константном домене CH1 первой тяжелой цепи по а) аминокислота в положении 147 и

аминокислота в положении 213 независимо заменены глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат) (см., например, Фиг. 1А, 2А, 2С, 3А, 3С).

34. Биспецифическое антитело, в частности, в соответствии с п. 33, характеризующееся наличием дополнительно к Fab-фрагменту указанного первого антитела (дополнительно называемого также ВСМА-Fab), а в константном домене CL указанного ВСМА-Fab аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и при этом в константном домене CH1 указанного ВСМА-Fab аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменена глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат) (см. например Фиг. 2А, 2С).

35. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся наличием

a) первой легкой цепи и первой тяжелой цепи первого антитела, соответствующие любому одному из вариантов реализации изобретения 1-7; и

b) второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и причем переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и при этом

c) в константном домене CL второй легкой цепи по b) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Кабат), и причем в константном домене CH1 второй тяжелой цепи по b) аминокислота в положении 147 и аминокислота в положении 213 независимо заменены глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно Кабат).

36. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся наличием набора тяжелых и легких цепей, выбранных из группы, состоящей из полипептидов

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

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

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

37. Способ получения антитела в соответствии с любым одним из пп. 1-36, включающий этапы

- a) трансформирования клетки-хозяина
- b) векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела в соответствии с любым одним из пп. 1-36,
- c) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез указанной молекулы антитела и
- d) выделения указанной молекулы из указанной культуры.

38. Клетка-хозяин, содержащая векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитело в соответствии с любым одним из пп. 1-36.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36, для применения в качестве лекарственного средства.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36, для применения в качестве лекарственного средства при лечении нарушений, связанных с плазматическими клетками.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36, для применения в качестве лекарственного средства при лечении множественной миеломы, плазмноклеточного лейкоза и AL-амилоидоза.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36, для применения в качестве лекарственного средства при системной красной волчанке.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с любым одним из пп. 1-36, включающее мультиспецифическое антитело, голое антитело с улучшенной АЗКЦ, конъюгат антитела-лекарственного средства или биспецифическое антитело для применения в качестве лекарственного средства при лечении антитело-опосредованного отторжения.

45. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий фрагмент распознавания антигена, направленный против ВСМА, и фрагмент активации Т-клеток, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело или фрагмент антитела в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 1-14.

46. Химерный антигенный рецептор (CAR) в соответствии с вариантом реализации изобретения 45, характеризующийся содержанием:

- (i) фрагмента распознавания антигена созревания В-клеток (BCMA);
- (ii) спейсерного домена и
- (ii) трансмембранный домен, и
- (iii) внутриклеточного домена передачи сигнала Т-клеток.

47. Химерный антигенный рецептор (CAR) в соответствии с вариантом реализации изобретения 45 или 46, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся наличием CDR3H-участка с SEQ ID NO:17 и CDR3L-участка с SEQ ID NO:20 и комбинации CDR1H-, CDR2H-, CDR1L- и CDR2L-участков, выбранных из группы из

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

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

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

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

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

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

48. Выделенная или очищенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), в соответствии с любым из вариантов реализации изобретения 45-47.

49. Способ получения моноклонального антитела, специфически связывающегося с BCMA, которое в качестве биспецифического антитела в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-36 вызывает деплетирование злокачественных плазматических клеток человека по меньшей мере на 80 % в аспиратах костного мозга с множественной миеломой ММ через 48 часов после лечения концентрацией анти-BCMA антитела в пределах 10 нМ и 1 фМ, характеризующегося

а) отбором методом пэннинга библиотеки фагового дисплея варибельной тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO:9 с помощью 1-50 нМ ВСМА яванского макака в 1-3 циклах и выбором варибельной тяжелой цепи, которая комбинируется с варибельной легкой цепью с SEQ ID NO:11 в биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-36, которое деплетирует такие злокачественные плазматические клетки человека таким образом,

с) отбором методом пэннинга библиотеки фагового дисплея варибельной легкой цепи (VL) с SEQ ID NO:11 с помощью 1-50 нМ ВСМА яванского макака в 1-3 циклах и b) выбором варибельной легкой цепи, которая комбинируется с варибельной тяжелой цепью с SEQ ID NO:9 в биспецифическое антитело в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 15-36, которое деплетирует такие злокачественные плазматические клетки человека таким образом, и

комбинированием указанной отобранной варибельной тяжелой цепи и выбранной варибельной легкой цепи с получением биспецифического антитела в соответствии с любым одним из вариантов реализации изобретения 4-16, которое деплетирует такие злокачественные плазматические клетки человека таким образом.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-36 и 45-47, для применения в качестве лекарственного средства при лечении множественной миеломы или системной красной волчанки, или плазмоклеточного лейкоза, или AL-амилоидоза.

В одном варианте реализации изобретения связывание антитела в соответствии с изобретением не снижается в присутствии 100 нг/мл APRIL на более 20 %, при измерении в анализе ELISA как ОП при 405 нм, по сравнению со связыванием указанного антитела с ВСМА человека без APRIL, APRIL-зависимая активация NF-κB не изменяется на более 20 % по сравнению с одним APRIL и активация NF-κB без APRIL не изменяется на более 20 % по сравнению с анализом без указанного антитела.

В одном варианте реализации изобретения связывание антитела при концентрации 6,25 нМ не снижается в присутствии 140 нг/мл мышинового APRIL на более 10 %, предпочтительно не снижается на более 1 %, при измерении в анализе ELISA как ОП при 450 нм, по сравнению со связыванием указанного антитела с ВСМА человека без APRIL. Связывание антитела при концентрации 50 нМ не снижается в присутствии 140 нг/мл мышинового APRIL на более 10 %, при измерении в анализе ELISA как ОП при 450 нм, по сравнению со связыванием указанного антитела с ВСМА человека без APRIL.

В одном варианте реализации изобретения связывание указанного антитела не снижается в присутствии 100 нг/мл APRIL и не снижается в присутствии 100 нг/мл BAFF на более 20 %, при измерении в анализе ELISA как ОП при 405 нм, по сравнению со связыванием указанного антитела с ВСМА человека без

APRIL или BAFF, соответственно, данное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB на более 20 % по сравнению с одним APRIL, не изменяет BAFF-зависимую активацию NF-κB на более 20 % по сравнению с одним BAFF и не изменяет активацию NF-κB без BAFF и APRIL на более 20 % по сравнению с анализом без указанного антитела.

В одном варианте реализации изобретения связывание указанного антитела не снижается в присутствии 100 нг/мл APRIL на более 15 %, при измерении в указанном ELISA, не снижается в присутствии 1000 нг/мл APRIL на более 20 %, при измерении в указанном ELISA, и не снижается в присутствии 1000 нг/мл APRIL на более 15 %, при измерении в указанном ELISA.

В одном варианте реализации изобретения связывание указанного антитела с BCMA человека не снижается в присутствии 100 нг/мл APRIL и не снижается в присутствии 100 нг/мл BAFF на более 15 %, при измерении в указанном ELISA, не снижается в присутствии 1000 нг/мл APRIL и не снижается в присутствии 1000 нг/мл BAFF на более 20 %, при измерении в указанном ELISA, и не снижается в присутствии 1000 нг/мл APRIL и не снижается в присутствии 1000 нг/мл BAFF на более 15 %, при измерении в указанном ELISA.

В одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с изобретением не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB на более 15 %, не изменяет BAFF-зависимую активацию NF-κB на более 15 % и не изменяет активацию NF-κB без APRIL и BAFF на более 15 %.

В одном варианте реализации изобретения связывание антитела с BCMA не снижается APRIL, не снижается BAFF на более 25 %, более 20 % и на более 10 %, измеренное как связывание указанного антитела при концентрации 5 нМ, предпочтительно 50 нМ, и 140 нМ для клеток NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) в присутствии или отсутствие APRIL или соответственно BAFF в концентрации 2,5 мкг/мл по сравнению со связыванием указанного антитела с клетками NCI-H929 без APRIL или BAFF, соответственно.

В одном варианте реализации изобретения следующие примеры, перечни последовательностей и фигуры предложены для облегчения понимания настоящего изобретения, настоящий объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Предполагается, что могут быть сделаны модификации без отклонения от сущности данного изобретения.

Материалы и общие методы

Методики рекомбинантных ДНК

Для работы с ДНК использовали стандартные методы, описанные в Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реактивы для молекулярной биологии использовали в соответствии с инструкциями изготовителя. Общая информация, соответствующая нуклеотидным последовательностям легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов человека предоставлена в: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242. Аминокислоты цепей антител нумерованы и обозначены согласно Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Синтез генов

а) Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных методом химического синтеза. Сегменты генов длиной 600 - 1800 п.н., которые фланкированы одиночными сайтами расщепления эндонуклеазами, собраны посредством отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование посредством указанных сайтов рестрикции, например KpnI/ Sad или AscI/PacI, в pPCRScript (Stratagene) на основе клонирующего вектора pGA4. Последовательности ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Фрагменты синтеза генов заказывали в соответствии с данными описаниями в компании Geneart (г. Регенсбург, Германия).

б) Требуемые сегменты генов, при необходимости, либо создавали методом ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали в Geneart (г. Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и продуктов ПЦР путем автоматизированного синтеза генов. Сегменты генов, фланкированные одиночными сайтами расщепления эндонуклеазами, клонировали в стандартных экспрессионных векторах или в секвенирующих векторах для дополнительного анализа. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий с использованием коммерчески доступных наборов для очистки плазмид. Концентрацию плазмид определяли методом УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Сегменты генов конструировали с подходящими сайтами рестрикции для обеспечения субклонирования в соответствующие экспрессионные векторы. Если требовалось, кодирующие белки гены конструировали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который ориентирует белки для секреции в эукариотических клетках.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем двухцепочечного секвенирования.

Анализ последовательностей ДНК и белков и работа с данными последовательностей

Для картирования, анализа, фиксации и иллюстрации последовательностей использовали пакет программного обеспечения Clone Manager версии 9.2 (программное обеспечение для научных и обучающих целей).

Экспрессионные векторы

а) Слитые гены, содержащие описанные цепи антител, создавали как описано ниже методом ПЦР и/или синтезом генов и собирали известными рекомбинантными методами и методиками, путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, используя уникальные сайты рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные последовательности нуклеиновых кислот проверяли секвенированием ДНК. Для проведения транзистентных трансфекций готовили большие количества плазмид путем получения плазмид из трансформированных культур *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

б) Для создания экспрессирующих анти-BCMA антитела векторов субклонировали последовательности ДНК переменных участков тяжелой и легкой цепи в рамке считывания либо с константной тяжелой цепью IgG1 человека, либо с константной легкой цепи IgG1 человека, предварительно вставленной в соответствующий экспрессионный вектор, общий для реципиента и оптимизированный для экспрессии в линиях клеток млекопитающих. Экспрессия антитела управляется химерным промотором MPSV, содержащим энхансер CMV и промотор MPSV, с последующим 5'-НТО, интроном и элементом MAR Ig каппа. Транскрипция прерывается синтетической сигнальной последовательностью polyA на 3'-конце CDS. Все векторы несут 5'-концевую последовательность ДНК, кодирующую лидерный пептид, который ориентирует белки для секреции в эукариотических клетках. В дополнение к этому, каждый вектор содержит последовательность EBV OriP для эписомальной репликации плазмид в экспрессирующих EBV EBNA клетках.

с) Для создания векторов для биспецифического антитела к BCMAxCD3, происходящие из IgG1 биспецифические молекулы состояли из по меньшей мере двух антигенсвязывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами CD3 и BCMA. Антигенсвязывающие фрагменты представляют собой Fab-фрагменты, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая содержит переменный и константный участок. По меньшей мере один из Fab-фрагментов представлял собой фрагмент «перекрестный Fab (Crossfab)», в котором VH и VL переставлены. Обмен VH и VL в пределах Fab-фрагмента обеспечивает то, что Fab-фрагменты различной специфичности не имеют идентичных перестроек доменов. Конфигурация биспецифической

молекулы являлась моновалентной для CD3 и бивалентной для ВСМА, в которой один Fab-фрагмент слит с N-концом внутреннего Crossfab (2+1). Биспецифическая молекула содержала Fc-часть для того, чтобы молекула имела длительный период полувыведения. Схематическое представление конструкций дано на Фиг. 2; предпочтительные последовательности конструкций показаны в виде SEQ ID NO от 39 до 52. Молекулы продуцировали путем котрансфекций клеток HEK293 EBNA, растущих в суспензии с экспрессионными векторами млекопитающих с использованием раствора на основе полимеров. Для получения конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:2:1:1 («вектор Fc(выступ)»: «вектор легкой цепи» : «вектор легкой цепи CrossFab» : «вектор тяжелой цепи-CrossFab»).

Методики культивирования клеток

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

Транзистная экспрессия в клетках HEK293 (система HEK293-EBNA)

Биспецифические антитела экспрессировали транзистной котрансфекцией соответствующих экспрессионных векторов млекопитающих в клетки HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии, с использованием раствора на основе полимеров. За одни сутки до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в концентрации 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавкой 6 мМ L-глутамин. Из каждого мл конечного объема продукции центрифугированием осаждали 2,0 млн. жизнеспособных клеток (5 минут при 210 x g). Отделяли аспирацией супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК каждого мл конечного объема продукции получали смешиванием 1 мкг ДНК (соотношение тяжелой цепи: модифицированной тяжелой цепи: легкой цепи: модифицированной легкой цепи = 1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимеров (1 мг/мл) смесь встряхивали на вихревой мешалке в течение 15 секунд и оставляли при комнатной температуре в течение 10 минут. Через 10 минут соединяли вместе ресуспендированные клетки и смесь ДНК/ раствора на основе полимеров, а затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали на устройство для встряхивания (37 °C, 5 % CO₂). Через 3 часа времени инкубирования на каждый мл конечного объема продукции добавляли 800 мкл среды Ex-Cell с добавкой 6 мМ L-глутамин, 1,25 мМ вальпроевой кислоты и 12,5 % Pepsoy (50 г/л). Через 24 часа на каждый мл конечного объема продукции добавляли 70 мкл питающего раствора. Через 7 суток или когда жизнеспособность клеток была равной или ниже 70 %, клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали стадией аффинной хроматографии и одной или двумя стадиями доочистки, представляющими катионообменную

хроматографию и эксклюзионную хроматографию. При необходимости использовали дополнительную стадию доочистки. Продуцировали рекомбинантное анти-BCMA антитело и биспецифические антитела в суспензии путем котрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами млекопитающих с использованием раствора на основе полимеров. Клетки трансфицировали двумя или четырьмя векторами, в зависимости от формата. Для IgG1 человека одна плазида кодировала тяжелую цепь, а другая плазида – легкую цепь. Для биспецифических антител котрансфицировали четыре плазмиды. Две из них кодировали две различные тяжелые цепи, а другие две кодировали две различные легкие цепи. За одни сутки до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в концентрации 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду F17 с добавкой 6 мМ L-глутамин.

Определение белка

Определение концентрации антитела выполняли измерением поглощения при 280 нм с использованием теоретического значения поглощения 0,1 % раствора антитела. Это значение основывалось на аминокислотной последовательности и рассчитывалось программным обеспечением GPMW (Lighthouse data).

ДСН-ПААГ-электрофорез

Гель-систему NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) использовали в соответствии с инструкциями изготовителя. В частности, использовали гели 10 % или 4-12 % NuPAGE® Novex® Бис-ТРИС Pre-Cast (pH 6,4) и подвижный буфер NuPAGE® MES (восстановленные гели, подвижный буфер NuPAGE® с добавкой антиоксиданта) или подвижный буфер MOPS (невосстановленные гели).

Очистка белков

Аффинная хроматография на белке А

Для проведения стадии аффинной хроматографии загружали супернатант на колонку с белком А (HiTrap с белком А FF, 5 мл, GE Healthcare), уравновешенную 6 CV 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5. После стадии промывки тем же буферным раствором антитело элюировали из колонки на стадии элюирования 20 мМ фосфатом натрия, 100 мМ хлорида натрия, 100 мМ глицина, pH 3,0. Фракции с требуемым антителом немедленно нейтрализовали 0,5 М фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно фильтровали и далее обрабатывали катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Катионообменная хроматография (например,

Для проведения стадии катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 буфером для элюирования с использованием стадии аффинной хроматографии и загружали на катионообменную колонку (Poros 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки буфером для уравнивания и буферным раствором для промывки, соответственно, 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ ТРИС, рН 5,0, и 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ ТРИС, 100 мМ хлорид натрия рН 5,0, белок элюировали градиентом с использованием 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ ТРИС, 100 мМ хлорида натрия рН 8,5. Фракции, содержащие требуемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и далее обрабатывали на стадии эксклюзионной хроматографии.

Аналитическая эксклюзионная хроматография

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

Измерение чистоты и содержания мономеров

Чистоту и содержание мономеров в конечном препарате белка определяли методом ДДС-КЭ (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, аналитическая эксклюзионная колонка column (Tosoh)) в буферном растворе 25 мМ фосфате калия, 125 мМ хлорид натрия, 200 мМ L-аргинина моногидрохлорид, 0,02 % (мас./об.) азид натрия, рН 6,7.

Подтверждение молекулярной массы анализами ЖХ-МС

Дегликозилирование

Для подтверждения получения гомогенного препарата из таких молекул конечный раствор белка анализировали анализом ЖХ-МС. Для удаления гетерогенности, введенной углеводами, конструкции обрабатывают ПНГазой F (ProZyme). Для этого рН раствора белка корректировали до рН 7,0 добавлением 2 мкл 2 М Трис к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг ПНГазы F и инкубировали в течение 12 ч при 37 °С.

Анализ ЖХ-МС – онлайн-анализ

Выполняли метод ЖХ-МС на ВЭЖХ Agilent 1200, связанном с ВП-масс-спектрометром 6441 (Agilent). Выполняли хроматографическое разделение на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6 x 250 мм; № по кат. 719510). Элюент А содержал 5 % ацетонитрила и 0,05 %

(об./об.) муравьиной кислоты в воде, элюент В содержал 95 % ацетонитрила, 5 % воды и 0,05 % муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40 °С и образец белка 6 мкг (15 мкл) получали с обработкой, описанной ранее.

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

Во время первых 4 минут элюат направляли в сброс для защиты масс-спектрометра от загрязнения солями. ESI-источник работал с потоком высушивающего газа 12 л/мин, температура 350 °С и давлении распылителя 60 psi. MS-спектры получали с использованием напряжения фрагментатора 380 В и диапазона масс от 700 до 3200 m/z с использованием режима образования положительных ионов. Данные MS получали с помощью программного обеспечения прибора от 4 до 17 минут.

Выделение МКПК человека из крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали центрифугированием на плотности Histopaque из обогащенных лимфоцитами препаратов (лейкотромбоцитарные слои), полученных из местных банков крови или из свежей крови, взятой у здоровых людей-доноров. Вкратце, разбавляли кровь стерильным ФСБ и осторожно наслаивали на градиент Histopaque (Sigma, H8889). После центрифугирования в течение 30 минут при 450 x g при комнатной температуре (тормоз выключен), удаляли часть плазмы над МКПК, содержащую межфазную границу. Переносили МКПК в новые пробирки Falcon на 50 мл и пробирки наполняли ФСБ до полного объема 50 мл. Центрифугировали смесь при комнатной температуре в течение 10 минут при 400 x g (тормоз включен). Удаляли супернатант и промывали осадок МКПК два раза стерильным ФСБ (стадии центрифугирования при 4 °С в течение 10 минут при 350 x g). Полученную популяцию МКПК автоматически подсчитывали

(ViCell) и хранили в среде RPMI1640, содержащей 10 % FCS и 1 % L-алинил-L-глутамин (Biochrom, K0302) при 37°C, 5 % CO₂ в инкубаторе до начала анализа.

Выделение первичных МКПК яванского макака из гепаринизированной крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали центрифугированием на плотности из свежей крови, взятой у здоровых доноров яванских макаков, следующим образом. Гепаринизированную кровь разбавляли 1:3 стерильным ФСБ и разбавляли среду Lymphoprep (Axon Lab, № 1114545) стерильным ФСБ до 90 %. Два объема разбавленной крови наслаивали на один объем разбавленного градиента плотности и разделяли фракцию МКПК центрифугированием в течение 30 мин при 520 x g, без применения тормоза, при комнатной температуре. Переносили полосу МКПК в свежую пробирку Falcon на 50 мл и промывали стерильным ФСБ путем центрифугирования в течение 10 мин при 400 x g при 4 °С. Выполняли центрифугирование при низкой скорости для удаления тромбоцитов (15 мин при 150 x g, 4 °С), а получаемую популяцию МКПК подсчитывали автоматическим способом (ViCell) и немедленно использовали для последующих анализов.

Примеры

Пример 1. Создание анти-ВСМА антител

Пример 1.1. Получение антигенов и рабочих реактивов

Пример 1.1.1. Рекомбинантный, растворимый, внеклеточный домен ВСМА человека

В качестве антигенов для отборов на фаговом дисплее использовали внеклеточные домены ВСМА человека, яванского макака и мыши, которые транзientно экспрессировали как N-концевое мономерное Fc-слияние в клетках НЕК EBNA и сайт-специфически биотинилировали посредством коэкспрессии биотинлигазы BirA в последовательности распознавания avi-маркера, расположенного на C-конце Fc-части, несущей рецепторную цепь (Fc цепь-выступ). Внеклеточные домены ВСМА человека и яванского макака состояли из от метионина 4 до аспарагина 53 и от метионина 4 до аспарагина 52, соответственно. Их по N-концам сливали с шарниром IgG1 человека, обеспечивающим гетеродимеризацию с неслитой Fc-частью IgG1 человека (цепь-углубление) с помощью технологии «выступы-в-углубления».

Пример 1.1.1А. Создание анти-ВСМА антител путем созревания

1.1.1А.1 Библиотеки и отборы

Конструировали две библиотеки на основе антитела 83A10. Эти библиотеки рандомизируют либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи (83A10 L1/L2), либо CDR1 и CDR2 тяжелой цепи (83A10 H1/H2),

соответственно. Каждую из этих библиотек конструировали 2 последовательными стадиями амплификации и сборки. Конечные собранные продукты расщепляли NcoI / BsiWI для получения библиотеки 83A10 L1/L2, MunI и NheI для получения библиотеки 83A10 H1/H2, вместе со сходным образом обработанными векторами-акцепторами на основе плазмидных препаратов клона 83A10. Следующие количества расщепленных рандомизированных (частично) V-доменов и расщепленного (-ых) вектора (-ов) лигировали с соответствующими библиотеками (мкг V-домена / мкг вектора): библиотека a.m. 83A10 L1/L2 (3/10), библиотека 83A10 H1/H2 (3/10), объединяли очищенные лигаты библиотек 83A10 L1/L2 и 83A10 H1/H2, соответственно, и использовали 15 трансформаций клеток E. coli TG1 для каждой из 2 библиотек, для получения конечных размеров библиотек из $2,44 \times 10^{10}$ для библиотеки 83A10 L1/L2 и $1,4 \times 10^{10}$ для библиотеки a.m. 83A10 H1/H2. Захватывали и очищали фагмидные частицы, отображающие эти Fab-библиотеки.

1.1.1A.2 Отбор клонов

Отбор клонов выполняли по отношению к эктодомену антигена созревания (BCMA) человека или яванского макака, с которым клонировали слева от оперона Fc и avi-маркер. Перед выполнением отбора планшеты с нейтравидином покрывали Fc деплетором в концентрации 500 нМ. Отбор выполняли согласно следующей схеме:

1) связывание $\sim 10^{12}$ фагмидных частиц библиотеки library.83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 с иммобилизованным Fc деплетором в течение 1 ч, 2) перенос несвязанных фагмидных частиц библиотеки 83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 с 50 нМ, 25 нМ, 10 нМ или 2 нМ BCMA человека или яванского макака (в зависимости от библиотеки или цикла отбора) в течение 20 мин, 3) добавление магнитных гранул со стрептавидином в течение 10 мин, 4) промывка магнитных гранул со стрептавидином с использованием 10×1 мл ФСБ/Tween® 20 и 10×1 мл ФСБ, 5) элюирование фаговых частиц добавлением 1 мл 100 мМ ТЕА (триэтиламина) в течение 10 мин и нейтрализация добавлением 500 мкл 1М Tris®/HCl pH 7,4 и 6) повторное введение клеток E. coli TG1 в log-фазе, инфицирование хелперным фагом VCSM13 и последующее осаждение фагмидных частиц ПЭГ/NaCl для использования в последующих циклах отбора.

Отбор выполняли в течение 3 циклов, а условия корректировали в 5 потоках отдельно для каждой из 2 библиотек. Подробно параметры отбора были следующими:

поток 1 (50 нМ huBCMA для цикла 1, 25 нМ супоBCMA для цикла 2, 10 нМ huBCMA для цикла 3), поток 2 (50 нМ huBCMA для цикла 1, 10 нМ huBCMA для цикла 2, 2 нМ huBCMA для цикла 3), поток 3 (50 нМ huBCMA для цикла 1, 25 нМ huBCMA для цикла 2, 10 нМ супоBCMA для цикла 3), поток 4

(50 нМ huBCMA для цикла 1, 25 нМ супоBCMA для цикла 2, 10 нМ супоBCMA для цикла 3), поток 5 (50 нМ супоBCMA для цикла 1, 25 нМ супоBCMA для цикла 2, 10 нМ супоBCMA для цикла 3).

Тяжелые цепи антител Mab 21, Mab 22, Mab 33 и Mab 42 получали из потока 5, который использовали только супоBCMA.

1.1.1A.3 Метод скрининга

Отдельные клоны экспрессировали в бактериях в виде 1 мл культур в 96-луночном формате и супернатанты подвергали скринингу методом ELISA. Специфические связывающие антитела определяли как сигналы, выше 5 x фонового уровня для BCMA человека и яванского макака, и сигналы, ниже 3 x фонового уровня для Fc деплетора. Покрытые нейтравидином 96-луночные рядные планшеты покрывали 10 нМ huBCMA, 10 нМ суBCMA или 50 нМ Fc деплетором, с последующим добавлением содержащих Fab бактериальных супернатантов и выявлением специфического связывания Fab посредством их Flag-маркеров путем использования анти-Flag/HRP вторичного антитела. ELISA-позитивные клоны экспрессировали в бактериях в виде 1 мл культур в 96-луночном формате и супернатанты подвергали кинетическому эксперименту для скрининга ProteOn. Идентифицировали 500 позитивных клонов, большинство из них имели сходную аффинность.

1.1.1A.4 Скрининг методом поверхностного плазмонного резонанса с растворимыми Fab и IgG

Методом ППР дополнительно исследовали 70 клонов. Все эксперименты выполняли при 25 °C с использованием в качестве подвижного буфера PBST (10 мМ ФСБ, pH 7,4 и 0,005 % (об./об.) Tween®20). На приборе ProteOn XPR36, оборудованном биосенсором с сенсорными чипами GLC и GLM, и с реактивами для связывания (10 мМ ацетат натрия, pH 4,5, сульфо-N-гидроксисукцинимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорид [EDC] и этаноламин), приобретенными у BioRad Inc. г. Геркулес, штат Калифорния). Иммуобилизации выполняли при 30 мкл/мин на чипе GLM. Связывали pAb (козла) анти-hu IgG, F(ab)₂ специфическое Ab (Jackson) в вертикальном направлении с использованием стандартной аминокислотной процедуры: все шесть каналов для лигандов активировали в течение 5 мин со смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Непосредственно после активации поверхностей pAb (козла) анти-hu IgG, F(ab)₂ специфическое антитело (50 мкл/мл, 10 мМ ацетат натрия, pH 5) вводили во все шесть каналов в течении 5 мин. В конце каналы блокировали с помощью инъекции 1 М этаноламина-HCl (pH 8,5) в течение 5 мин. Конечные уровни иммуобилизации были аналогичны для всех каналов, составляя в диапазоне от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab захватывались из супернатантов *E. coli* путем одновременного введения вдоль пяти отдельных целых горизонтальных каналов (30 мкг/мл) в течение 5 мин и это приводило к уровням в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; кондиционированную среду вводили вдоль

шестого канала для обеспечения «параллельно работающего» холостого опыта для целей использования двойного эталона. Одноступенчатые кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин вдоль вертикальных каналов. Диссоциацию отслеживали в течение 5 мин. Данные по кинетике анализировали в программе ProteOn Manager v. 2.1. Обработка данных для пятна реакции вовлекала применение эталона, полученного при сравнении между пятнами, и стадии измерения двойного эталона с использованием параллельного холостого буферного раствора (Myszka, 1999). Обработанные данные от повторных одноступенчатых введений подбирали по простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Для измерений IgG из супернатантов продукции в НЕК в 6-луночном формате, варианты Fab захватывались из супернатантов НЕК293 путем одновременного введения вдоль пяти отдельных целых горизонтальных каналов (30 мкг/мл) в течение 5 мин и это приводило к уровням в диапазоне от 200 до 400 RU; кондиционированную среду вводили вдоль шестого канала для обеспечения «параллельно работающего» холостого опыта для целей использования двойного эталона. Одноступенчатые кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин вдоль вертикальных каналов. Диссоциацию отслеживали в течение 5 мин. Данные по кинетике анализировали как описано выше. Измерения OSK суммировали в табл. 2D; н/и, недостоверное измерение. Обнаружено, что аффинность huBCMA составляла около от 50 пМ до 5 нМ. Обнаружено, что аффинность супоBCMA составляла около от 2 нМ до 20 нМ (несколько клонов выпали из диапазона, см. Фиг. 17).

1.1.1A5. Дополнительный отбор клонов HC и LC

Благодаря своему опыту изобретатели отобрали из этих 70 клонов дополнительно 27 клонов на основе их свойств связывания с huBCMA, супоBCMA, мышинным BCMA, и соотношению, измеренные в различных анализах. Из этих клонов отбирали клоны 4VN и 9VL, которые привели к 34 комбинациям VN/VL. Измеряли аффинность связывания на клетках НЕК-huBCMA (Фиг. 18 и табл. 2E). Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значимо лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК. Однако были отобраны Mab21, Mab 22, Mab27, Mab33, Mab39 и Mab42, благодаря их совокупным свойствам, как аффинность к huBCMA, супоBCMA, связывание в виде биспецифического антитела с BCMA-позитивными линиями клеток множественной миеломы H929, L363 и RPMI-8226 методом проточной цитометрии, уничтожение активности миеломных клеток H929, L363 и RPMI-8226 из жизнеспособных миеломных плазматических клеткок, полученных из аспиринов костного мозга пациентов, и данных фармакокинетики (ФК) и фармадинамики (уничтожение BCMA-позитивных клеток) у яванских макаков.

Таблица 2С. Взаимоотношения антител к потокам

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

Таблица 2D. Одноступенчатые кинетические измерения аффинности с ВСМА человека, яванского макака и мыши

№ Mab	VH	VL	KD	KD	KD
			huBCMA	суBCMA	muBCMA
83A10	pCON1532	pCON1080	1.5E-09	1.4E-08	н/и
Mab 21	pCON1531	pCON1522	2.8E-11	5.1E-11	7.3E-10
Mab 22	pCON1531	pCON1521	4.8E-11	н/и	9.0E-10
Mab 27	pCON1520	pCON1522	3.9E-13	1.0E-10	9.7E-10
Mab 33	pCON1530	pCON1522	1.7E-11	3.4E-11	4.9E-10
Mab 39	pCON1524	pCON1522	6.2E-11	2.7E-10	н/и
Mab 42	pCON1531	pCON1527	2.3E-10	3.9E-10	2.5E-09

Таблица 2Е. Связывание вариантов IgG на клетках НЕК-huBCMA

№ Mab	VH	VL	EC50	EC50
			связывания [нМ]	связывания [мкг/мл]

83A10	PCON1532	PCON1080	2,4	0,34
Mab 14	PCON1530	PCON1527	1,47	0,21
Mab 21	pCON1531	PCON1522	2,46	0,35
Mab 22	PCON1531	pCON1521	2,08	0,30
Mab 23	PCON1531	PCON1519	4,97	0,71
Mab 27	PCON1520	PCOM1522	10,57	1,52
Mab 28	PCON1520	PCOM1521	11,34	1,63
Mab 30	PCON1530	PCON1526	10,35	1,49
Mab 31	PCON1530	PCON1525	1,34	0,19
Mab 33	pCOM1530	PCON1522	1,18	0,17
Mab 34	PCON1530	PCON1521	1,24	0,18
Mab 35	PCON1530	PCON1519	1,63	0,23
Mab 39	PCON1524	PCON1522	1,73	0,25
Mab 42	PCON1531	pCON1527	2,10	0,30
Mab 44	PCON1520	PCON1527	1,55	0,22

Пример 1.2. BCMA-экспрессирующие клетки в качестве рабочих клеток

Пример 1.2.1. Линии миеломных клеток человека, экспрессирующие BCMA на своей поверхности, и количественное определение количества рецепторов BCMA на клеточной поверхности

Экспрессию BCMA оценивали на пяти линиях миеломных клеток человека (NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 и JLN-3) методом проточной цитометрии. Клетки NCI-H929 ((H929) ATCC® CRL-9068™) культивировали в 80-90 % RPMI 1640 с 10-20 % инактивированной нагреванием FCS и с возможным добавлением 2 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия и 50 мкМ меркаптоэтанол. Клетки RPMI-8226 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) культивировали в среде, содержащей 90 % RPMI 1640 и 10 % инактивированной нагреванием FCS. Клетки U266B1 ((U266) ATCC® TIB-196™) культивировали в среде RPMI-1640, модифицированной добавлением 2 mM L-глутамина, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия, 4500 мг/л глюкозы и 1500 мг/л бикарбоната натрия и 15 % инактивированной нагреванием FCS. Линию клеток L-363 (Институт Лейбница DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и культур

клеток; DSMZ № ACC 49) культивировали в 85 % RPMI 1640 и 15 % инактивированной нагреванием FCS. Линию клеток JN-3 (DSMZ № ACC 541) культивировали в 40 % MEM в модификации Дульбекко + 40 % MDM в модификации Искова + 20 % инактивированной нагреванием FBS. Вкратце, клетки собирали, промывали, подсчитывали жизнеспособность, ресуспендировали в концентрации 50000 клеток/лунку на 96-луночный круглодонный планшет и инкубировали с антителом против ВСМА человека (Abcam, № ab54834, IgG1 мыши) при 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °С (для предотвращения интернализации). IgG1 мыши использовали в качестве изотипного контроля (BD Biosciences, № 554121). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 350 x g), дважды промывали и инкубировали с конъюгированным с ФИТЦ антимишным вторичным антителом в течение 30 мин при 4 °С. В конце периода времени инкубации клетки центрифугировали (5 мин при 350 x g), промывали дважды буферным раствором FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS и анализировали на запущенной программном обеспечении FACS Diva устройства CantoII. Относительное количественное определение рецепторов ВСМА на поверхностной мембране линии миеломных клеток H929, RPMI-8226 и U266B1 оценивали анализом QIFIKIT (Dako, № K0078, следуя инструкциям производителя). Клетки H929 экспрессировали ВСМА человека с наибольшей плотностью, до 5-6 раз больше других линии миеломных клеток. H929 считается линией миеломных клеток, экспрессирующей высокий уровень ВСМА, по сравнению с U266 и L363, которые экспрессируют ВСМА на среднем/низком уровне, RPMI-8226, которые являются миеломными клетками с низкой экспрессией ВСМА, и JN-3, которые являются миеломными клетками с очень низкой экспрессией ВСМА. В табл. 3 обобщены относительные количества рецепторов ВСМА на клеточной поверхности линии клеток множественной миеломы человека в каждом эксперименте (n=5).

Таблица 3. Количественное определение количества рецепторов ВСМА на мембранной поверхности линий миелом клеток человека H929, L363, RPMI-8226, U266B1 и JN-3

Линии миеломных клеток человека	Емкость специфического связывания антигена (SABC)				
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4	Эксперимент 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16970	/	11300	11228	/
U266(B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072

JJN-3	/	/	/	/	650
-------	---	---	---	---	-----

Пример 2. Анализы связывания ВСМА: поверхностный плазмонный резонанс

Оценку связывания анти-ВСМА антител с рекомбинантным ВСМА методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) выполняли следующим образом. Все эксперименты ППР выполняли на Biacore T200 при 25 °С с HBS-EP в качестве подвижного буфера (0,01 М ГЭПЭС pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005 % поверхностно-активного вещества P20, Biacore, Фрайбург/Германия). Определяли avidность взаимодействия между анти-ВСМА антителами и рекомбинантным ВСМА Fc(kih) (человека и яванского макака). Биотинилированные рекомбинантные ВСМА Fc(kih) человека и яванского макака непосредственно связывали с чипом SA согласно инструкциям (Biacore, Фрайбург/Германия). Уровень иммобилизации находился в диапазоне от 200 до 700 RU. Анти-ВСМА антитела пропускали в 2-кратном диапазоне концентраций (от 1,95 до 500 нМ) с потоком 30 мкл/минуту через проточные ячейки в течение 120 секунд. Диссоциацию отслеживали в течение 180 секунд. Необработанные отличия показателей преломления корректировали вычитанием величины ответа, полученной на эталонной проточной ячейке. В ней анти-ВСМА антитела пропускали над чистой поверхностью, предварительно активированной и дезактивированной, как описано в стандартном наборе для аминного связывания. Кажущиеся кинетические константы получали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Уппсала/Швеция) для подбора уравнений скорости связывания 1:1 по Лэнгмюру численным интегрированием, несмотря на бивалентность взаимодействия для целей сравнения. Определяли также аффинность взаимодействия между анти-ВСМА антителами и рекомбинантным ВСМА Fc(kih) человека. Античеловеческое Fab-антитело (GE Healthcare) непосредственно связывалось на чипе CM5 при pH 5,0 с использованием стандартного набора для аминного связывания (Biacore, Фрайбург/Германия). Уровень иммобилизации составлял около 6500 RU. Анти-ВСМА антитело захватывалось в течение 90 секунд при 25 нМ. Рекомбинантный ВСМА человека пропускали в 4-кратном диапазоне концентраций (от 1,95 до 500 нМ) с потоком 30 мкл/минуту через проточные ячейки в течение 120 секунд. Диссоциацию отслеживали в течение 120 секунд. Необработанные отличия показателей преломления корректировали вычитанием величины ответа, полученной на эталонной проточной ячейке. В ней рекомбинантный пропускали над поверхностью с иммобилизованным античеловеческим Fab-антителом, но на которую вместо анти-ВСМА антитела был нанесен HBS-EP. Кинетические константы получали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T100 (vAA, Biacore AB, Уппсала/Швеция) для подбора уравнений скорости связывания 1:1 по Лэнгмюру численным интегрированием (табл. 4).

Таблица 4. Константы аффинности, определенные подбором уравнений скорости связывания 1:1 по Лэнгмюру

Лиганд	Аналит	Kon [1/Mc]	Koff [1/c]	KD [M]
83A10 IgG	huBCMA Fc(kih)	5.07E+05	2.92E-03	5.76E-09
	cyноBCMA Fc(kih)	2.29E+05	2.03E-02	8.86E-08
Mab 21 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.51E+05	4.39E-05	5.16E-11
	cyноBCMA Fc(kih)	4.91E+05	2.35E-04	4.78E-10
Mab 22 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.14E+05	5.15E-05	6.33E-11
	cyноBCMA Fc(kih)	4.54E+05	4.42E-04	9.74E-10
Mab 42 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.03E+05	2.98E-04	3.71E-10
	cyноBCMA Fc(kih)	7.07E+05	4.53E-04	6.41E-10
Mab 27 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.59E+05	5.93E-05	1.65E-10
	cyноBCMA Fc(kih)	2.16E+05	4.55E-04	2.11E-09
Mab 33 IgG	huBCMA Fc(kih)	2.00E+05	3.55E-05	1.78E-10
	cyноBCMA Fc(kih)	1.32E+05	9.76E-05	7.39E-10
Mab 39 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.61E+05	5.58E-05	1.55E-10
	cyноBCMA Fc(kih)	2.15E+05	4.67E-04	2.17E-09

Пример 3. Гэп аффинности антитела человека/яванского макака (hu/cyно)

Учитывая значения аффинности, описанные в примере 2, сравнивали аффинность анти-BCMA антител к BCMA человека по сравнению с BCMA яванского макака и рассчитывали значения соотношения (гэп) cyно/hu (табл. 5). Гэп аффинности cyно/hu рассчитывали как значение аффинности антитела к BCMA яванского макака деленное на аффинность к BCMA человека и он означает, что BCMA-антитело

связывается с ВСМА человека с x -кратной аффинностью связывания по сравнению с ВСМА яванского макака, где x = значение гэпа суно/hu. Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5. Аффинность анти-ВСМА антител к ВСМА человека по сравнению с ВСМА яванского макака и значения гэпа суно/hu

α -ВСМА IgG	K_D ВСМА человека [M]	K_D ВСМА яванского макака [M]	Гэп аффинности суно/ hu
83A10	5.76E-09	8.86E-08	15,3
Mab 21	5.16E-11	4.78E-10	9,3
Mab 22	6.33E-11	9.74E-10	15,4
Mab 42	3.71E-10	6.41E-10	1,7
Mab 27	1.65E-10	2.11E-09	12,7
Mab 33	1.78E-10	7.39E-10	4,2
Mab 39	1.55E-10	2.17E-09	14

Пример 4. Создание анти-ВСМА /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток

Анти-ВСМА/анти-CD3 биспецифические антитела Т-клеток создавали в соответствии с WO2014/122144, который включен в данный документ путем ссылки.

Пример 4.1. Анти-CD3 антитела

Термин «CD3 ϵ или CD3», используемый в данном документе, относится к CD3 ϵ человека, описанном под кодом UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин «антитело против CD3, анти-CD3 антитело» относится к антителу, связывающемуся с CD3 ϵ . Предпочтительно данное антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи и переменного домена VL, содержащего CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Предпочтительно, антитело содержит переменные домены SEQ ID NO:7 (VH) и SEQ ID NO:8 (VL). Анти-CD3 антитело, описанное выше, использовали для создания биспецифических антител Т-клеток, которые использовали в следующих примерах.

Пример 4.2. Создание анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток формата 2+1 с содержанием Fc

В качестве исходных веществ использовали кДНК, кодирующие полные тяжелую и легкую цепи соответствующих анти-BCMA антител-IgG1, а также кДНК VH и VL анти-CD3-антител. Для каждого биспецифического антитела в четырех белковых цепях включено содержание тяжелой и легкой цепей соответствующего анти-BCMA антитела и тяжелой и легкой цепи анти-CD3 антитела, соответственно, описанные выше. С целью минимизации образования боковых продуктов с неправильно спаренными тяжелыми цепями, например, с двумя тяжелыми цепями анти-CD3 антитела, использовали мутировавший гетеродимерный Fc-участок, несущий «мутации выступ-в-углубление» и сконструированную дисульфидную связь, как описано в WO2009080251 и WO2009080252. С целью минимизации образования боковых продуктов с неправильно спаренными тяжелыми цепями, например, с двумя легкими цепями анти-BCMA антитела, к тяжелым и легким цепям анти-CD3 антитела применяют перекрест константного каппа CH1 x с использованием методологии, описанной в WO2009080251 и WO2009080252.

а) Анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическое антитело Т-клеток в формате 2+1, т. е. биспецифическое антитело (Fab)₂ x (Fab), которое является бивалентным для BCMA и моновалентным для CD3, может обладать преимуществами в активности, предсказуемости по эффективности и безопасности, потому что оно может предпочтительно связываться с BCMA опухолевой мишени и избегать поглощения антител CD3, таким образом обеспечивая более высокую вероятность воздействия лекарственного средства, фокусирующегося на опухоли.

Анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическое антитело Т-клеток формата 2+1 (т. е. биспецифическое (Fab)₂ x (Fab) антитело), бивалентное для BCMA и моновалентное для CD3, содержащее Fc, получали из BCMA-антител человека, отобранных ранее. В качестве исходных веществ использовали кДНК, кодирующие полные Fab (домены VH и CH1 тяжелой цепи плюс домены VL и CL легкой цепи) соответствующих анти-BCMA антител-IgG1, а также кДНК VH и VL анти-CD3-антител. Для каждого биспецифического антитела в четырех белковых цепях включено содержание тяжелой и легкой цепей соответствующего анти-BCMA антитела и тяжелой и легкой цепей анти-CD3 антитела, соответственно, описанные выше, с Fc-участками.

Вкратце, каждое биспецифическое антитело продуцировали путем одновременной котрансфекции четырех экспрессионных векторов млекопитающих, кодирующих, соответственно: а) кДНК полной легкой цепи соответствующего BCMA-антитела, б) слитую кДНК, созданную стандартными методами молекулярной биологии, такими как ПЦР сращивания перекрывающимися расширениями, обеспечивая кодирование слитого белка, составленного из (в порядке от N- до С-конца) секреторной лидерной

последовательности, Fab (VH, с последующими CH1-доменами) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого линкера глицин(Gly)-серин(Ser) с последовательностью Gly-Gly-Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser, Fab (VH с с последующими CH1-доменами) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого линкера глицин(Gly)-серин(Ser) с последовательностью Gly-Gly- Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser, VH анти-CD3 антитела, описанного выше, и константного каппа-домена кДНК легкой цепи человека, с) слитую кДНК, созданную стандартными методами молекулярной биологии, такими как ПЦР сращивания перекрывающимися расширениями, обеспечивая кодирование слитого белка, составленного из (в порядке от N- до C-конца) секреторной лидерной последовательности, VL анти-CD3 антитела, описанного выше, константного CH1-домена кДНК IgG1 человека. Для котрансфекции клеток млекопитающих, продукции и очистки антител использовали способы, описанные выше для продукции человеческих или гуманизированных антител-IgG1 с одной модификацией: для очистки антител первую стадию захватывания выполняют не с применением белка А, а вместо него использовали колонку для аффинной хроматографии, наполненную смолой, связывающейся с константным участком легкой цепи каппа человека, такой как KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). В дополнение к этому, для увеличения стабильности и выхода могли включать дисульфид, а также дополнительные остатки, образующие ионные мостики и увеличивающие выходы гетеродимеризации (EP 1870459A1).

Для создания векторов для биспецифического антитела к BCMAxCD3, происходящие из IgG1 биспецифические молекулы состояли из по меньшей мере двух антигенсвязывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами CD3 и BCMA. Антигенсвязывающие фрагменты представляли собой Fab-фрагменты, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая содержала переменный и константный участок. По меньшей мере один из Fab-фрагментов представлял собой фрагмент «прекрестный Fab (Crossfab)», в котором константные домены Fab тяжелой и легкой цепи были переставлены. Перестановка константных доменов тяжелой и легкой цепей в пределах Fab-фрагмента обеспечивает то, что Fab-фрагменты различной специфичности не имеют идентичных перестроек доменов и, следовательно, не обмениваются легкими цепями. Конфигурация биспецифической молекулы являлась моновалентной для CD3 и бивалентной для BCMA, в которой один Fab-фрагмент был слит с N-концом внутреннего Crossfab (2+1). Биспецифическая молекула содержала Fc-часть для того, чтобы обеспечить более длительный период полувыведения. Схематическое представление конструкций дано на Фиг. 1-3; последовательности предпочтительных конструкций показаны в табл. 2А. Молекулы продуцировали путем котрансфекций клеток НЕК293 EBNA, растущих в суспензии с экспрессионными векторами млекопитающих с использованием раствора на основе полимеров. Для получения конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:2:1:1 («вектор Fc(выступ)»: «вектор легкой цепи» : «вектор легкой цепи CrossFab» : «вектор тяжелой цепи-CrossFab»).

Пример 4.3. Создание анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток для сравнения

Создание BCMA50-sc(Fv)₂ (также известных как BCMA50-BiTE®) анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток и применяемых аминокислотных последовательностей проводили в соответствии с WO2013072406 и WO2013072415.

Пример 5. Создание и очистка анти-BCMA /анти-CD3 Fc-содержащих биспецифических антител (2+1) Т-клеток с заряженными вариантами

Анти-BCMA/анти-CD3 биспецифические антитела Т-клеток получали и очищали в соответствии с WO2014/122144, который включен в данный документ путем ссылки.

Для получения биспецифических антител, экспрессировали биспецифические антитела транзientной котрансфекцией соответствующих экспрессионных векторов млекопитающих в клетки HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии с использованием раствора на основе полимеров. За одни сутки до трансфекции клетки HEK293-EBNA высеивали в концентрации 1,5 млн. жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавкой 6 mM L-глутамин. Из каждого мл конечного объема продукции центрифугированием осаждали 2,0 млн. жизнеспособных клеток (5 минут при 210 x g). Отделяли аспирацией супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК каждого мл конечного объема продукции получали смешиванием 1 мкг ДНК (соотношение тяжелой цепи: модифицированной тяжелой цепи: легкой цепи: модифицированной легкой цепи = 1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимеров (1 мг/мл) смесь встряхивали на вихревой мешалке в течение 15 секунд и оставляли при комнатной температуре в течение 10 минут. Через 10 минут соединяли вместе ресуспендированные клетки и смесь ДНК/ раствора на основе полимеров, а затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали на устройство для встряхивания (37 °C, 5 % CO₂). Через 3 часа времени инкубирования на каждый мл конечного объема продукции добавляли 800 мкл среды Ex-Cell с добавкой 6 mM L-глутамин, 1,25 mM вальпроевой кислоты и 12,5 % Pepsoy (50 г/л). Через 24 часа на каждый мл конечного объема продукции добавляли 70 мкл питающего раствора. Через 7 суток или когда жизнеспособность клеток была равной или ниже 70 %, клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали стадией аффинной хроматографии и одной или двумя стадиями доочистки, представляющими катионообменную хроматографию и эксклюзионную хроматографию. При необходимости использовали дополнительную стадию доочистки.

Для проведения стадии аффинной хроматографии загружали супернатант на колонку с белком А (HiTrap с белком А FF, 5 мл, GE Healthcare), уравновешенную 6 CV 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, pH 7,5. После стадии промывки тем же буферным раствором антитело элюировали из колонки на стадии элюирования 20 mM фосфатом натрия, 100 mM хлорида натрия, 100 mM глицина, pH

3,0. Фракции с требуемым антителом немедленно нейтрализовали 0,5 М фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно фильтровали и далее обрабатывали катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Для проведения стадии катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 буфером для элюирования с использованием стадии аффинной хроматографии и загружали на катионообменную колонку (Poros 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки буфером для уравнивания и буферным раствором для промывки, соответственно, 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ ТРИС, pH 5,0, и 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ ТРИС, 100 мМ хлорид натрия pH 5,0, белок элюировали градиентом с использованием 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ ТРИС, 100 мМ хлорида натрия pH 8,5. Фракции, содержащие требуемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и далее обрабатывали на стадии эксклюзионной хроматографии.

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

Определение концентрации антитела выполняли измерением поглощения при 280 нм с использованием теоретического значения поглощения 0,1 % раствора антитела. Это значение основывалось на аминокислотной последовательности и рассчитывалось программным обеспечением GPMAW (Lighthouse data).

Чистоту и содержание мономеров в конечном препарате белка определяли методом ДДС-КЭ (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, аналитическая эксклюзионная колонка column (Tosoh)) в буферном растворе 25 мМ фосфате калия, 125 мМ хлорид натрия, 200 мМ L-аргинина моногидрохлорид, 0,02 % (мас./об.) азид натрия, pH 6,7.

Для проверки молекулярной массы готовых белковых препаратов и подтверждения гомогенного препарата молекул готового раствора белка применяли жидкостную хроматографию-масс спектрометрию (ЖХ-МС). Сначала выполняли стадию дегликозилирования. Для удаления гетерогенности, введенной углеводами, конструкции обрабатывали ПНГазой F (ProZyme). Для этого pH раствора белка корректировали до pH 7,0 добавлением 2 мкл 2 М Трис к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг ПНГазы F и инкубировали в течение 12 ч при 37 °С. Затем выполняли ЖХ-МС выявление в режиме онлайн. Выполняли метод ЖХ-МС на ВЭЖХ Agilent 1200, связанном с ВП-масс-спектрометром 6441 (Agilent). Выполняли хроматографическое разделение на

полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6 x 250 мм; № по кат. 719510). Элюент А содержал 5 % ацетонитрила и 0,05 % (об./об.) муравьиной кислоты в воде, элюент В содержал 95 % ацетонитрила, 5 % воды и 0,05 % муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40 °С и образец белка 6 мкг (15 мкл) получали с обработкой, описанной ранее.

Во время первых 4 минут элюат направляли в отходы для защиты масс-спектрометра от загрязнения солями. ESI-источник работал с потоком высушивающего газа 12 л/мин, температура 350 °С и давления распылителя 60 psi. MS-спектры получали с использованием напряжения фрагментатора 380 В и диапазона масс от 700 до 3200 m/z с использованием режима образования положительных ионов. Данные MS получали с помощью программного обеспечения прибора от 4 до 17 минут.

На Фиг. 10 EP14179705 (включен путем ссылки) изображены графики ДДС-КЭ (невосстанавливающие условия) готовых белковых препаратов после различных методов очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv. Примененные к антителу 83A10-TCB стадии очистки аффинной хроматографией на белке А (РА) и эксклюзионной хроматографии (SEC) приводили к чистоте <30 % и содержанию мономера 82,8 % (А). Когда к готовым белковым препаратам в (А) применяли дополнительные стадии очистки, включавшие катионообменную хроматографию (cIEX) и стадии конечной эксклюзионной хроматографии (re-SEC), чистота увеличивалась до 93,4 %, но содержание мономера оставалось таким же, а выход существенно снижался до 0,42 мг/л. Однако, когда к 83A10 анти-BCMA Fab CL-CH1, а именно антителу 83A10-TCBsv, применяли специфические модификации заряда, могли уже наблюдать превосходный профиль продукции/очистки молекулы TCB, что продемонстрировано чистотой 95,3 %, содержанием мономера 100 % и выходом до 3,3 мг/л, даже когда применяли стадии очистки РА + cIEX + SEC (С), по сравнению с (В) с профилем продукции/очистки, показавшим в 7,9 раз более низкий выход и на 17,2 % более низкое содержание мономера, несмотря на дополнительную стадию очистки re-SEC.

Для дополнительной оценки преимуществ заряженных модификаций CL-CH1, примененных к антителам, впоследствии проводили завершающий цикл продукции для сравнения профиля продукции/очистки антител 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCBsv. Обе молекулы 83A10-TCB и 83A10-TCBsv представлены в молекулярной форме, описанной на Фиг. 2а. Как описано на Фиг. 11, свойства антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv измеряли параллельно и сравнивали после каждой стадии очистки 1) только аффинная хроматография на РА (А, В), 2) аффинная хроматография на РА, затем SEC (С, D) и 3) аффинная хроматография на РА, затем SEC, потом cIEX и re-SEC (Е, F). На Фиг. 11 EP14179705 (включен путем ссылки) продемонстрировано графики ДДС-КЭ (невосстанавливающие условия) готовых белковых растворов после соответствующих методов очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv. Как показано на Фиг. 11А и 11В EP14179705 (включен путем ссылки), наблюдали

улучшения при применении заряженных вариантов в отношении антитела ТСВ уже после очистки только аффинной хроматографией РА. В этом завершающем исследовании, примененная к антителу 83A10-ТСВ стадия очистки аффинной хроматографией РА приводила к чистоте 61,3 %, выходу 26,2 мг/л и содержанию мономера 63,7 % (11А). При сравнении, когда антитело 83A10-ТСВ очищали аффинной хроматографией РА, все свойства улучшались с получением лучшей степени чистоты 81,0 %, лучшего выхода 51,5 мг/л и содержания мономера 68,2 % (11В). Когда к конечным белковым препаратам применяли дополнительную стадию очистки SEC, как показано на Фиг. 12А и 12В EP14179705 (включен путем ссылки), то 83A10-ТСВ достигало чистоты 69,5 %, выхода 14,1 мг/л и содержания мономера 74,7 % (С) по сравнению с 83A10-ТСВ_{св} с улучшенной чистотой и содержанием мономера до 91,0 % и 83,9 %, соответственно, и выходом 10,3 мг/л (D). Даже несмотря на незначительно меньший выход (т. е. менее 27 %) 83A10-ТСВ_{св}, чем 83A10-ТСВ в этом конкретном эксперименте, процентное содержание корректной молекулы оказывалось немного лучше для 83A10-ТСВ_{св}, чем для 83A10-ТСВ, соответственно, 90 % по сравнению с 40-60 %, при измерении ЖХ-МС. В третьем завершающем сравнении конечные белковые препараты 83A10-ТСВ и 83A10-ТСВ_{св} из Фиг. 11С и 11D EP14179705 (включен путем ссылки) объединяли с получением приблизительно 1 л (эквивалентный объем) соответствующих конечных белковых препаратов из другой серии очистки (та же продукция) только после стадии аффинной хроматографии РА. Затем объединенные белковые препараты дополнительно очищали методами очистки cIEX и SEC. Как изображено на Фиг. 11Е и 11F EP14179705 (включен путем ссылки), улучшения профиля продукции/очистки антитела ТСВ с заряженными вариантами наблюдали по существу по сравнению с антителом ТСВ без заряженного варианта. После применения нескольких стадий методов очистки (т. е. РА +/- SEC + cIEX + SEC) для очистки антитела 83A10-ТСВ, достигали только 43,1 % чистоты и возможного достижения содержания мономера 98,3 %, но за счет ухудшения выхода, который снижался до 0,43 мг/л. Процентное содержание корректной молекулы, как измерено методом ЖХ-МС, было все еще плохим 60-70 %. Наконец, качество конечного белкового препарата было не приемлемо для применения *in vitro*. В полную противоположность, когда те же стадии многократной очистки с той же хронологией применяли к антителу 83A10-ТСВ_{св}, достигали чистоты 96,2 % и содержания мономера 98,9 %, а также 95 % корректной молекулы, как измерено методом ЖХ-МС. Однако выход также был в значительной мере снижен до 0,64 мг/л после стадии очистки cIEX. Результаты показывают, что лучшая чистота, более высокое содержание мономера, более высокое процентное содержание корректной молекулы и лучший выход можно достигать только для антитела 83A10-ТСВ_{св} после двух стандартных стадий очистки, т. е. аффинная хроматография РА и SEC (Фиг. 11D EP14179705), тогда как такие свойства не могут достигаться для 83A10-ТСВ, даже когда применяли дополнительные стадии очистки (Фиг. 11Е EP14179705).

В табл. 12 EP14179705 (включен путем ссылки) обобщены свойства 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после стадии очистки PA. В табл. 13 EP14179705 (включен путем ссылки) обобщены свойства 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после стадий очистки PA и SEC. В табл. 14 EP14179705 (включен путем ссылки) обобщены свойства 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после PA и SEC плюс только PA, затем стадий очистки cIEX и ге-SEC. Для табл. 12-14 EP14179705 (включен путем ссылки), значения выделенные жирным шрифтом обозначают более высокое качество по сравнению 83A10-TCB с 83A10-TCVcv. С одним исключением (т. е. выход соответствующего количества, см. табл. 13 EP14179705 (включен путем ссылки), которое не может быть репрезентативным, все параметры продукции/очистки и значения, полученные из 3 завершающих экспериментов сравнения, были выше для 83A10-TCBcv по сравнению с 83A10-TCB. Общие результаты, явно демонстрирующие, что преимущества признаков продукции/очистки можно достигать с применением заряженных модификаций CL-CH1 с антителами TCB, и которые требовали только две стадии очистки (т. е. аффинная хроматография PA и SEC) для достижения белковых препаратов уже высокого качества с очень хорошими свойствами для возможности разработки. На основе улучшенных свойств продукции/очистки получены 83A10-TCBcv, 21-TCBcv, 22-TCBcv, 27-TCBcv, 33-TCBcv, 39-TCBcv и 42-TCBcv с заряженными вариантами, аналогичным образом как и 83A10-TCBcv.

Таблица 6. Профиль продукции/очистки анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток после стадии очистки аффинной хроматографии на белке А

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	61,3	81,0
Выход (мг/л)	26,2	51,5
Количество (мг)	24,3	50,2
Мономер (%)	63,7	68,2
Корректная молекула по ЖХ-МС (%)	н.о.	н.о.

Таблица 7. Профиль продукции/очистки анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток после стадий очистки аффинной хроматографии на белке А и эксклюзионной хроматографии

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	69,5	91,0
Выход (мг/л)	14,1	10,3
Количество (мг)	13,1	10,0
Мономер (%)	74,7	83,9
Корректная молекула по ЖХ-МС (%)	40-60	90

Таблица 8. Профиль продукции/очистки анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток после стадий очистки 1.а) аффинной хроматографии на белке А и эксклюзионной хроматографии и 1.б) аффинной хроматографии на белке А только для объединенных вместе, а затем 2) катионообменная хроматография и 3) конечной эксклюзионной хроматографии

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

Пример 6. Связывание анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток с BCMA-позитивными линиями клеток множественной миеломы (проточная цитометрия)

Анти-BCMA/анти-CD3 антитела TCB (21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv, 83A10-TCBcv) анализировали методом проточной цитометрии на связывание с BCMA человека на BCMA-экспрессирующих клетках H929, L363 и RPMI-8226. В качестве отрицательного контроля применяли MKN45 (линия клеток аденокарцинома желудка, которая не экспрессирует BCMA). Вкратце, культивированные клетки собирали, подсчитывали и оценивали жизнеспособность клеток с использованием ViCell. Затем корректировали концентрацию жизнеспособных клеток до 2×10^6 клеток на мл в содержащем БСА буферном растворе FACS для окрашивания (BD Biosciences). Далее переносили отбирали аликвоту 100 мкл этой суспензии на лунку в круглодонный 96-луночный планшет и инкубировали с 30 мкл анти-BCMA антител или соответствующего контрольного IgG в течение 30 мин при 4 °С. Титровали все анти-BCMA/анти-CD3 антитела TCB (и контрольные TCB) и анализировали в диапазоне конечных концентраций 1-300 нМ. Затем центрифугировали клетки (5 мин, 350 x g), промывали 120 мкл/лунку буферного раствора FACS для окрашивания (BD Biosciences), ресуспендировали и инкубировали для дополнительной обработки 30 мин при 4 °С конъюгированным с флуорохромом, конъюгированным с PE и F(ab')₂-фрагментом AffiniPure специфическим к Fc-фрагменту антителом козла к IgG человека (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Затем дважды промывали клетки буферным раствором для окрашивания (BD Biosciences), фиксировали с использованием 100 мкл на лунку буферного раствора BD для фиксации (№ BD Biosciences, 554655) при 4 °С в течение 20 мин, ресуспендировали в 120 мкл буферного раствора FACS и анализировали с использованием BD FACS CantoII. Если применимо, рассчитывали EC50 с использованием Prism GraphPad (г. Ла-Хойя, штат Калифорния, США) и обобщали значения EC50, отмечающие концентрацию антитела, необходимую для достижения 50 % максимального связывания для связывания анти-BCMA/анти-CD3 антител TCB с клетками H929, клетками L363 и клетками RPMI-8226 в табл. 8, табл. 9 и табл. 10, соответственно. Звездочкой отмечены предполагаемые значения EC50, экстраполированные и рассчитанные программным обеспечением Prism. Значения EC50 для связывания 21-TCBcv с клетками L363 и связывание 22-TCBcv с клетками RPMI-8226 рассчитать было невозможно.

Таблица 8. Значения EC50 для связывания анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток с клетками H929 множественной миеломы

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

Таблица 9. Значения EC50 для связывания анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток с клетками L363 множественной миеломы

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

Таблица 10. Значения EC50 для связывания анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток с клетками RPMI-8226 множественной миеломы

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

Пример 7. Продукция цитокинов из активированных Т-клеток при связывании анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток с CD3-позитивными Т-клетками и BCMA-позитивными линиями клеток множественной миеломы (анализ СВА - проба высвобождения цитокинов)

Анализовали анти-BCMA/анти-CD3 биспецифические антитела Т-клеток на их способность индуцировать *de novo* опосредованную Т-клетками продукцию цитокинов в присутствии или отсутствие экспрессирующих BCMA миеломных клеток человека (RPMI-8226, JJN-3). Вкратце, из лейкоцитомобитарных слоев выделяли МКПК человека и высаживали 0,3 миллиона клеток на лунку на круглодонный 96-луночный планшет. В альтернативном варианте реализации помещали 280 мкл цельной крови, взятой у здоровых доноров, на лунку 96-луночного планшета с глубокими лунками. Добавляли BCMA-позитивные опухолевые клетки-мишени для получения конечного соотношения Е:Т равного 10: 1. Анти-BCMA/анти-CD3 антитела TCB и контроли добавляют до конечной концентрации 0,1 пМ – 10 нМ. После инкубации до 24 ч при 37 °С, 5 % CO₂, центрифугируют аналитический планшет в течение 5 мин при 350 x g и переносят супернатант в новый 96-луночный планшет с глубокими

лунками для последующего анализа. Выполняли анализ СВА на FACS CantoII в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II для выявления цитокинов человека Th1/Th2 (BD № 551809) или комбинацию следующих комплектов СВА Flex: для человеческого гранзима В (BD #560304), комплект Flex для человеческого IFN- γ (BD № 558269), комплект Flex для человеческого TNF- α (BD № 558273), комплект Flex для человеческого IL-10 (BD № 558274), комплект Flex для человеческого IL-6 (BD № 558276), комплект Flex для человеческого IL-4 (BD № 558272), комплект Flex для человеческого IL-2 (BD № 558270). В табл. 13 показано, что 83A10-TCB ν индуцировали зависимое от концентрации увеличение продукции цитокинов и сериновой протеазы гранзима В, маркера цитотоксической функции Т-клеток. В табл. 11 показаны значения EC50 и количество секретированных цитокинов/протеаз на определенные концентрации анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток.

Таблица 11. Секретия цитокинов и протеаз, индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток в присутствии клеток RPMI-8226

Цитокины/ протеазы	EC50 (нМ)	Концентрация 83A10-TCB ν (нМ)						
		0,00064	0,0032	0,016	0,08	0,4	2	10
TNF- α (пг/мл)	0,52	-6,95	-6,49	-0,65	46,72	161,24	315,11	371,47
IL-10 (пг/мл)	0,30	-9,21	1,95	25,17	125,82	401,42	602,64	680,05
Гранзим В (пг/мл)	0,34	220,54	331,55	889,13	5855,02	15862,84	21270,43	27120,52

Пример 8. Перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность для миеломных клеток H929 с высоким уровнем экспрессии, индуцируемая анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (колориметрический анализ высвобождения LDH)

Анализировали анти-BCMA/анти-CD3 антитела TCB на их потенциальную способность индуцировать опосредованный Т-клетками апоптоз у клеток ММ с высоким уровнем экспрессии BCMA при перекрестном связывании данной конструкции посредством связывания антигенсвязывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, собирали клетки-мишени множественной миеломы H929 с высоким уровнем экспрессии BCMA человека с помощью буферного раствора для снятия клеток, промывали и ресуспендировали в RPMI с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). На 96-луночный круглодонный планшет высевали приблизительно 30000 на лунку и добавляли соответствующее разведение конструкции для получения требуемой конечной концентрации (в трех

повторах); конечные концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для соответствующего сравнения корректировали все конструкции и контроли ТСВ до аналогичной молярной концентрации. В лунки добавляли МКПК человека (эффекторные клетки) для получения конечного соотношения Е:Т равного 10:1, соответствующего соотношению Е:Т приблизительно от 3 до 5 Т-клеток на 1 опухолевую клетку-мишень. Группы отрицательного контроля были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации определяли максимальный лизис клеток-мишеней ММ Н929 (= 100 %) путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1 % Тритона X-100, индуцировавшей гибель клеток. Минимальный лизис (= 0 %) представлен клетками-мишенями, совместно инкубированными только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифического антитела Т-клеток. Через 20-24 ч или 48 ч инкубации при 37 °С, 5 % CO₂, из апоптических/некротических клеток-мишеней в супернатант высвобождается LDH, которую затем измеряют с помощью набора для выявления LDH (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения LDH отмечали на графике по сравнению с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC50 измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая вызывает 50 % от максимального высвобождения LDH. Как показано на Фиг. 4, все анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение BCMA-позитивных миеломных клеток Н929, как измерено по высвобождению LDH. Лизис клеток Н929 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ не связывается с BCMA-позитивными клетками-мишенями, а связывание только с CD3 на Т-клетках не индуцировало высвобождение LDH даже при самых высоких исследованных концентрациях. В табл. 12 обобщены значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-клетками, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ, клеток Н929 с высоким уровнем экспрессии BCMA.

Таблица 12. Значения EC50 для перенаправленного уничтожения клеток Н929 Т-клетками, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ

Анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ	EC50 (пМ)					
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5	Донор 6
21-ТСВcv	97,1	/	42,1	53,9	38,7	/
22-ТСВcv	53,2	/	42,2	23,2	28,9	/
42-ТСВcv	9,7	/	11,7	7,2	6,8	/
83A10-ТСВcv	3,9	/	8,5	5,0	4,3	1,5

Пример 9. Перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность для миеломных клеток L363 со средним/низким уровнем экспрессии, индуцируемая анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (анализ высвобождения LDH)

Анализировали также анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ на их способность индуцировать опосредованный Т-клетками апоптоз у клеток ММ со средним/низким уровнем экспрессии BCMA при перекрестном связывании данной конструкции посредством связывания антигенсвязывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, собирают клетки-мишени множественной миеломы L363 со средним/низким уровнем экспрессии BCMA человека с помощью буферного раствора для снятия клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). На 96-луночный круглодонный планшет высевают приблизительно 30000 на лунку и добавляют соответствующее разведение конструкции для получения требуемой конечной концентрации (в трех повторах); конечные концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для соответствующего сравнения корректируют все конструкции и контроли ТСВ до аналогичной молярной концентрации. В лунки добавляли МКПК человека (эффektorные клетки) для получения конечного соотношения Е:Т равного 10:1, соответствующего соотношению Е:Т приблизительно от 3 до 5 Т-клеток на 1 опухолевую клетку-мишень. Группы отрицательного контроля были представлены только эффektorными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации определяют максимальный лизис клеток-мишеней ММ (= 100 %) путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1 % Тритона X-100, индуцировавшей гибель клеток. Минимальный лизис (= 0 %) представлен клетками-мишенями, совместно инкубированными только с эффektorными клетками, т. е. без какого-либо биспецифического антитела Т-клеток. Через 20-24 ч инкубации при 37 °С, 5 % CO₂, из апоптических/некротических клеток-мишеней в супернатант высвобождается LDH, которую затем измеряют с помощью набора для выявления LDH (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения LDH отмечали на графике по сравнению с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC₅₀ измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая вызывает 50 % от максимального высвобождения LDH. Как показано на Фиг. 5, все анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение BCMA-позитивных миеломных клеток L363, как измерено по высвобождению LDH. Лизис клеток L363 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ не связывается с BCMA-позитивными клетками-мишенями, а связывание только с CD3 на Т-клетках не индуцировало высвобождение LDH даже при самых высоких исследованных

концентрациях. В табл. 13 обобщены значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-клетками, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ, клеток L363 со средним/низким уровнем экспрессии BCMA.

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

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

Пример 10. Перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность для миеломных клеток RPMI-8226 со средним/низким уровнем экспрессии, индуцируемая анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (анализ высвобождения LDH)

Анализировали анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ на их способность индуцировать опосредованный Т-клетками апоптоз у клеток ММ со средним/низким уровнем экспрессии BCMA при перекрестном связывании данной конструкции посредством связывания антигенсвязывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, собирают клетки-мишени множественной миеломы L363 со средним/низким уровнем экспрессии BCMA человека с помощью буферного раствора для снятия клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). На 96-луночный круглодонный планшет высевают приблизительно 30000 на лунку и добавляют соответствующее разведение конструкции для получения требуемой конечной концентрации (в трех повторах); конечные концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для соответствующего сравнения корректируют все конструкции и контроли ТСВ до аналогичной молярной концентрации. В лунки добавляли МКПК человека (эффекторные клетки) для получения конечного соотношения Е:Т равного 10:1, соответствующего соотношению Е:Т приблизительно от 3 до 5 Т-клеток на 1 опухолевую клетку-мишень. Группы отрицательного контроля были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации определяли максимальный лизис клеток-мишеней ММ (= 100 %) путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1 % Тритона X-100,

индуцировавшей гибель клеток. Минимальный лизис (= 0 %) представлен клетками-мишенями, совместно инкубированными только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифического антитела Т-клеток. Через 20-24 ч инкубации при 37 °С, 5 % CO₂, из апоптических/некротических клеток-мишеней в супернатант высвобождается LDH, которую затем измеряют с помощью набора для выявления LDH (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения LDH отмечали на графике по сравнению с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC50 измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая вызывает 50 % от максимального высвобождения LDH. Как показано на Фиг. 6, все анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение BCMA-позитивных миеломных клеток RPMI-8226, как измерено по высвобождению LDH. Лизис клеток RPMI-8226 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ не связывается с BCMA-позитивными клетками-мишенями, а связывание только с CD3 на Т-клетках не индуцировало высвобождение LDH даже при самых высоких исследованных концентрациях. В табл. 13 обобщены значения EC50 для перенаправленного уничтожения Т-клетками, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ, клеток RPMI-8226 со средним/низким уровнем экспрессии BCMA.

Таблица 13. Значения EC50 для перенаправленного уничтожения клеток RPMI-8226 Т-клетками, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ

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

Пример 11. Перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность для миеломных клеток JJN-3 с низким уровнем экспрессии, индуцируемая анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (проточная цитометрия и высвобождение LDH)

Анализировали анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ на их способность индуцировать опосредованный Т-клетками апоптоз у клеток ММ с низким уровнем экспрессии BCMA при перекрестном связывании данной конструкции посредством связывания антигенсвязывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, собирают клетки-мишени множественной миеломы JJN-3 с низким уровнем экспрессии

BCMA человека с помощью буферного раствора для снятия клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). На 96-луночный круглодонный планшет высевают приблизительно 30000 на лунку и добавляют соответствующее разведение конструкции для получения требуемой конечной концентрации (в трех повторах); конечные концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для соответствующего сравнения корректируют все конструкции и контроли ТСВ до аналогичной молярной концентрации. В лунки добавляли МКПК человека (эффektorные клетки) для получения конечного соотношения Е:Т равного 10:1, соответствующего соотношению Е:Т приблизительно от 3 до 5 Т-клеток на 1 опухолевую клетку-мишень. Группы отрицательного контроля были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации определяли максимальный лизис клеток-мишеней ММ (= 100 %) путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1 % Тритона X-100, индуцировавшей гибель клеток. Минимальный лизис (= 0 %) представлен клетками-мишенями, совместно инкубированными только с эффекторными клетками, т. е. без какого-либо биспецифического антитела Т-клеток. i) Через 48 ч инкубации при 37°C, 5 % CO₂, культивированные миеломные клетки собирали, промывали и окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами и аннексином-V для определения апоптических миеломных клеток. Набор для окрашивания содержал CD138-APCC750/CD38-ФИТЦ/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/ аннексин-V-PerCP-Cy5.5. И использованные меченые флуорохромом антитела приобретали у BD Biosciences (г. Сан-Хосе, штат Калифорния) и Caltag Laboratories (г. Сан-Франциско, штат Калифорния). Получение данных выполняли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, прибор CantoII под управлением программного обеспечения FACS Diva или проточный цитометр FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных применялась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). На клетках JLN-3 измеряли аннексин-V и на графике отмечали процентное содержание аннексин-*v*-позитивных клеток JLN-3 по сравнению с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток. Процент лизиса клеток JLN-3, индуцированного конкретной концентрацией анти-BCMA/анти-CD3 биспецифического антитела Т-клеток, также определяли путем измерения абсолютного числа аннексин-V-негативных клеток JLN-3 при данной концентрации ТСВ и вычитания его из абсолютного числа аннексин-V-негативных клеток JLN-3 без использования ТСВ, деленного на абсолютное число аннексин-V-негативных клеток JLN-3 без использования ТСВ. На Фиг. 7 показано, что анти-BCMA/анти-CD3 антитела ТСВ (22-, 42- и 83A10-ТСВ_{cv}) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение миеломных клеток JLN-3 с низким уровнем экспрессии BCMA, как измерено методом проточной цитометрии. Лизис клеток JLN-3 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ не связывается с BCMA-позитивными клетками-мишенями, а связывание только с CD3 на Т-клетках не индуцировало увеличение аннексин-*v*-позитивных клеток JLN-3 или лизиса клеток JLN-3 даже при самых высоких исследованных концентрациях. В табл. 14 и табл.

15 обобщены соответственно процентные содержания аннексин-*v*-позитивных клеток JN-3 и проценты лизиса клеток JN-3, индуцированные анти-BCMA/анти-CD3 антителами TCB.

Выявление LDH также выполняли через 20-24 ч или 48 ч инкубации при 37 °C, 5 % CO₂. Затем измеряют высвобождение LDH из апоптических/некротических клеток-мишеней JN-3 MM в супернатант с помощью набора для выявления LDH (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения LDH отмечают на графике по сравнению с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC50 измеряют с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела TCB, которая вызывает 50 % от максимального высвобождения LDH.

Таблица 14. Перенаправленное уничтожение клеток JN-3 с низким уровнем экспрессии BCMA Т-клетками, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 антителами TCB: процентные содержания аннексин-*V*-позитивных клеток

Эксперимент 1							
Аннексин- <i>V</i> - позитивные клетки JN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	16,78	10,21	9,12	11,11	11,36	8,14	9,6
42-TCBcv	24,83	16,84	8,62	12,3	11,9	/	9,6
22-TCBcv	22,95	26,15	12,48	13,29	9,3	12,48	9,6
Контрольное TCB	8,84	/	/	/	/	/	/
Эксперимент 2							
Аннексин- <i>V</i> - позитивные клетки JN-3 (%)	Концентрация анти-BCMA/анти-CD3 TCB (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	22,86	17,53	16,5	15,94	14,32	13,07	10,74
42-TCBcv	26,88	21,68	14,42	13,6	13,47	12,75	10,74
22-TCBcv	29,72	26,97	18,35	15,94	15	14,8	10,74
Контрольное TCB	12,82	/	/	/	/	/	/

Таблица 15. Перенаправленное уничтожение клеток JN-3 с низким уровнем экспрессии ВСМА Т-клетками, индуцированное анти-ВСМА/анти-CD3 антителами ТСВ: процентные значения лизиса клеток JN-3

Эксперимент 1							
Лизис клеток JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-ТСВcv	70,30	26,66	18,43	41,88	24,42	-14,45	0,00
42-ТСВcv	92,92	84,02	41,87	38,96	40,29	/	0,00
22-ТСВcv	88,02	90,54	56,26	73,56	-4,29	26,28	0,00
Контрольное ТСВ	-6,55	/	/	/	/	/	/
Эксперимент 2							
Лизис клеток JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ (пМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-ТСВcv	51,18	25,30	20,12	39,58	-1,88	22,28	0,00
42-ТСВcv	90,37	81,12	55,32	39,44	34,94	17,62	0,00
22-ТСВcv	91,21	94,12	53,03	41,66	24,36	36,47	0,00
Контрольное ТСВ	4,18	/	/	/	/	/	/

Пример 12. Экспрессия ВСМА на миеломных плазматических клетках костного мозга, взятых у пациентов с множественной миеломой

Линии клеток человека, экспрессирующие интересующую опухолевую мишень, являются очень полезными и практичными инструментами для измерения активности антител ТСВ для индукции цитотоксичности для опухолевых клеток в присутствии Т-клеток и определения значений ЕС50 для ранжирования молекул ТСВ. Тем не менее, несмотря на легкость доступа и работы, у линий клеток миеломы человека имеется ограничение, заключающееся в отсутствии предоставления гетерогенности множественной миеломы, очень сложного заболевания, характеризующегося значительной гетерогенностью на молекулярном уровне. В дополнение к этому, линии клеток миеломы не экспрессируют рецептор ВСМА с такой же интенсивностью и плотностью, так как некоторые клетки

экспрессируют ВСМА более сильно, чем другие (например, клетки H929 по сравнению с клетками RPMI-8226) и такая гетерогенность на клеточном уровне также может наблюдаться среди различных пациентов. На всех этапах академического взаимодействия между ключевыми лидерами мнений по множественной миеломе изучается определение экспрессии ВСМА и плотности в образцах пациентов и оценка анти-ВСМА/анти-CD3 антител ТСВ с клиническими образцами пациентов. Отбирают кровь и аспираты костного мозга у пациентов с множественной миеломой после получения информированного согласия в соответствии с руководствами местных комитетов по этике и Хельсинкской декларации.

а) Экспрессия ВСМА при выявлении многопараметрической проточной цитометрией (средняя интенсивность флуоресценции)

Для определения экспрессии рецептора ВСМА на миеломных клетках костного мозга выполняли иммунофенотипические анализы с использованием свежевыделенных аспириатов цельного костного мозга. Для иммунофенотипических анализов использовали образцы цельного костного мозга, обработанные антикоагулянтом К₃-ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) с лизированными эритроцитами. В общей сумме окрашивали, лизировали, а затем промывали 2×10^6 клеток на пробирку, используя методику прямой иммунофлуоресценции и многоцветное окрашивание, которое помогало при специфической идентификации и определения иммунофенотипических характеристик злокачественных плазматических клеток, идентифицированных как CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Затем окрашивали клетки, используя набор из конъюгированных с флуорохромом антител, включающих по меньшей мере CD38-ФИТЦ/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC. Используемые меченые флуорохромом антитела приобретают у BD Biosciences (г. Сан-Хосе, штат Калифорния) и Caltag Laboratories (г. Сан-Франциско, штат Калифорния). Для иммунофенотипических анализов использовали самостоятельно полученное конъюгированное с APC антитело против ВСМА человека. Получение данных выполняли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, прибор CantoII под управлением программного обеспечения FACS Diva или проточный цитометр FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных применялась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). Экспрессию ВСМА измеряли отбором на гейте популяции злокачественных плазматических клеток, определяли значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) и сравнивали их среди пациентов с миеломой.

Таблица 16. Экспрессия ВСМА на миеломных плазматических клетках костного мозга пациентов при выявлении многопараметрической проточной цитометрией (средняя интенсивность флуоресценции)

№ пациента	МFI _{BCMA}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678
P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615
P23	159

б) Определение емкости специфического связывания антигена BCMA (количественный проточный цитометрический анализ)

Для количественного определения емкости специфического связывания антигена BCMA (SABC) на клеточной поверхности миеломных плазматических клеткок костного мозга пациента применяли метод Qifikit (Dako). Плазматические клетки миеломы, выделенные из аспиратов цельного костного мозга человека, окрашивали с помощью 50 мкл IgG мыши против BCMA человека (BioLegend № 357502) или

изотипным контролем IgG2a мыши (BioLegend № 401501), разбавленных буферным раствором для FACS (ФСБ, 0,1 % БСА) до конечной концентрации 25 мкг/мл (или при насыщенных концентрациях), и выполняли окрашивание в течение 30 мин при 4 °С в темноте. Далее в отдельные лунки добавляли 100 мкл гранул для подготовки или калибровки и клетки, также гранулы дважды промывали буферным раствором для FACS. Клетки и гранулы ресуспендировали в 25 мкл буферного раствора для FACS, содержащем конъюгированные с флуоресцеином антимышиным вторичным антителом (в насыщающих концентрациях), предоставленным Qifkit. Клетки и гранулы окрашивали в течение 45 мин при 4 °С в темноте. Клетки промывали один раз и все образцы ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора для FACS. Образцы анализировали непосредственно на многоцветном проточном цитометре с установленным программным обеспечением (например, прибор CantoII под управлением программного обеспечения FACS Diva или проточный цитометр FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST).

Таблица 17. Емкость специфического связывания антигена ВСМА на плазматических клетках миеломы костного мозга пациентов при измерении количественным проточным цитометрическим анализом

№ пациента	SABC _{ВСМА}
P1	н/д
P2	н/д
P3	679
P4	145
P5	957
P6	969
P7	554
P8	4479
P9	350
P10	414
P11	2756
P12	2911
P13	1267

P14	3453
P15	1006
P16	1097
P17	1622
P18	429
P19	1684
P20	383
P21	1602
P22	799
P23	204

Пример 13. Перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность для миеломных плазматических клеток костного мозга в присутствии аутологических инфилтрирующих костный мозг Т-клеток, индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (многопараметрическая проточная цитометрия)

Одна из наиболее значимых и критических характеристик *in vitro* во время доклинической оценки потенциальных антител ТСВ для лечения множественной миеломы является возможность молекулы ТСВ активировать Т-клетки пациента и индуцировать перенаправленную Т-клетками гибель первичных плазматических клеток миеломы из костного мозга пациента. Для оценки влияния анти-BCMA/анти-CD3 антител ТСВ индуцировать перенаправленную Т-клетками гибель миеломных плазматических клеток костного мозга собирали аспираты цельного костного мозга у пациентов с множественной миеломой в покрытые ЭДТК пробирки и немедленно использовали их для анализов культур клеток. Соотношение эффекторных клеток и опухолевых клеток (соотношение Е:Т), присутствующее в образцах цельного костного мозга, определяли и измеряли проточной цитометрией. Вкратце, переносили 200 мкл образцов костного мозга в 96-луночные планшеты с глубокими лунками. В стерильной среде готовили разведения анти-BCMA/анти-CD3 антител ТСВ и контрольных антител и добавляли 10 мкл препарата к соответствующим лункам до конечных концентраций в диапазоне от 0,1 пМ до 30 нМ. Осторожным встряхиванием смешивают суспензию антител-костного мозга, а затем инкубируют при 37 °С, 5 % CO₂ в течение 48 ч, закрывая парафиновой пленкой. После периода инкубации готовили 20 мкл соответствующего раствора антитела для FACS на основе набора антител,

включая добавление CD138-APCC750/CD38-ФИТЦ/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/ CD45-V450/BCMA-APC/Annexin-V-PerCP-Cy5.5 в 96-луночный планшет с U-образным дном. Меченые флуорохромом антитела приобретали у BD Biosciences (г. Сан-Хосе, штат Калифорния) и Caltag Laboratories (г. Сан-Франциско, штат Калифорния) и использовали самостоятельно полученное конъюгированное с APC антитело против BCMA человека. Затем образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре и получали данные и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Определяли гибель миеломных клеток путем определения аннексин-V-положительной экспрессии по захваченных в гейты популяциях миеломных клеток CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Затем определяли процент гибели миеломных клеток. Процент лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга пациентов, индуцированного конкретной концентрацией анти-BCMA/анти-CD3 биспецифического антитела Т-клеток, также определяли путем измерения абсолютного числа аннексин-V-негативных миеломных плазматических клеток при данной концентрации ТСВ и вычитания его из абсолютного числа аннексин-V-негативных миеломных плазматических клеток без использования ТСВ, деленного на абсолютное число аннексин-V-негативных миеломных плазматических клеток без использования ТСВ. Для проверки специфичности анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток также измеряли экспрессию аннексина-V в других типах клеток костного мозга, таких как Т-клетки, В-клетки и НК-клетки. Как показано на Фиг. 8, наблюдали зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента без наблюдения лизиса Т-клеток, В-клеток и НК-клеток. В дополнение к этому, не отмечена индукция клеточной гибели миеломных плазматических клеток с помощью контрольного ТСВ, которое связывается с CD3, но не с BCMA, при наибольших концентрациях антител ТСВ. Как показано в табл. 18, процентное содержание аннексин-V-положительных миеломных клеток костного мозга при наибольшей концентрации (30 нМ) достигало до 52,54 % и 55,72 % для 42-ТСВ_{sv} и 22-ТСВ_{sv}, соответственно, по сравнению с 29,31 % для 83A10-ТСВ_{sv}, что позволяет заключить, что 42-ТСВ_{sv} и 22-ТСВ_{sv} являются более активными, чем 83A10-ТСВ_{sv} в отношении индукции гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента.

Таблица 18. Процентное содержание аннексин-V-положительных миеломных плазматических клеток из аспиринов костного мозга пациентов, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток.

Аннексин-V-положительные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0

83A10-TCBcv	29,31	30,95	23,14	15,74	16,76	13,11
42-TCBcv	52,54	39,87	29,96	10,51	19,6	13,11
22-TCBcv	55,72	51,71	31,01	14,81	14,19	13,11
Контрольное TCB	15,18	10,93	/	/	/	/

В другом исследовании в аспиратах костного мозга, взятых у 5 различных пациентов с ММ, определяли процентное содержание жизнеспособных миеломных плазматических клеток путем отбора в гейт популяции аннексин-V-негативных клеток и нанесении на график по сравнению с концентрацией анти-BCMA/анти-CD3 биспецифического антитела Т-клеток. Значения EC50 измеряли и определяли в виде концентрации антител TCB, которая приводит к 50 % от максимального количества жизнеспособных миеломных плазматических клеток. Определяли EMAX (%) как максимум жизнеспособных миеломных плазматических клеток в присутствии анти-BCMA/анти-CD3 биспецифического антитела Т-клеток. 83A10-TCBcv было намного более активным в индукции лизиса миеломных плазматических клеток, чем 22-TCBcv и 42-TCBcv в большинстве из пяти образцов аспиратов костного мозга пациентов с миеломой (табл. 26, на Фиг. 9 показаны в качестве примера кривые концентрации-ответа для 2 из 5 пациентов). Зависимое от концентрации снижение жизнеспособных миеломных клеток наблюдали в 5/5 образцов, взятых у пациентов, леченных 22-TCBcv или 42-TCBcv, по сравнению с только 1/5 образцом пациента для 83A10-TCBcv. В табл. 19 показано сравнение 83A10-TCBcv с 22-TCBcv и 42-TCBcv и влияние анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток на выживание миеломных плазматических клеток костного мозга. Данные результаты явно показывают, что отмечено меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга для 22-TCBcv и 42-TCBcv (т. е. больше лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга) в 4/5 образцах пациентов, как продемонстрировано более низкими значениями EMAX (%) для 22-TCBcv и 42-TCBcv по сравнению с 83A10-TCBcv в соответствующих образцах пациентов. Наблюдали зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента без наблюдения лизиса незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны).

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

Образец аспирата костного мозга пациентов (исследование 2)	83A10-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
---	--------------------	-----------------	-----------------

	EMAX (%)		
Пациент 001	100	7,6	22,6
Пациент 003	54,3	38,9	44,6
Пациент 004	100	66,6	53,9
Пациент 006	81,8	65,9	73,5
Пациент 007	81,8	48,6	72,8

В дополнительных исследованиях новых анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток по данному изобретению по сравнению с 83A10-TCBvc семь свежесобраных образцов/аспираатов цельного костного мозга пациентов окрашивали с помощью магнитных микрогранул CD138 (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS и собирали фракции с достаточным количеством оставшихся плазматических клеток MM, обычно в дополнительных экспериментах использовали >4 % миеломных плазматических клеток. В 24-луночных планшетах инкубировали и культивировали 500000 клеток/лунку в течение 48 часов. К соответствующим лункам добавляли разведения анти-BCMA/анти-CD3 антител TCB и контрольных антител до конечной концентрации TCB от 0,1 пМ до 10 нМ. Каждую точку дозы исследовали в трех повторах. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследовали двойным -окрашиванием пропидием йодидом/CD138- ФИТЦ с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Как изображено на Фиг. 10, на гистограмме показано средние значения, нормализованные по среднему из трех повторов к соответствующему контролю со средой (MC). Для статистического анализа использовали однопараметрический t-тест. Максимальное ингибирование роста плазматических клеток MM при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, были представлены в виде процента по отношению к контролю со средой. Изображено также максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 нМ) по сравнению с контрольной средой. Расчеты выполняли с использованием R 3.1.19, а также Bioconductor 2.13.10, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Влияние считалось статистически значимым, если значение P- его соответствующего статистического критерия составляло <5 % (*), <1 % (**) или <0,1 % (***). Как показано на Фиг. 10A-10G, данные результаты ясно показывают, что отмечено меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга для 22-TCBvc и 42-TCBvc (т. е. больше лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга) в 7/7 образцах пациентов по сравнению с 83A10-TCBvc. В табл. 20 продемонстрировано изменение процентного содержания жизнеспособных миеломных

плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациентов, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток относительно контроля со средой. На табл. 21 показаны значения IMAХ10 и IMAХ1. Данные результаты демонстрируют, что 22-TCVcv и 42-TCVcv явно более активно, чем 83A10-TCVcv, индуцируют уничтожение миеломных плазматических клеток костного мозга пациентов. Несмотря на специфический лизис плазматических клеток костного мозга (BMPC), индуцированный анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток и наблюдаемый во всех образцах костного мозга пациентов, в соответствующих образцах микроокружение костного мозга (BMME) не подвергалось воздействию (Фиг. 10H, репрезентативная для 7 образцов пациента).

Таблица 20. Относительное процентное содержание негативных по пропидию йодиду жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациентов, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток.

Образец пациента № 1 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	181,3	106,3	31,3	9,4
42-TCVcv	81,3	15,6	9,4	9,4
22-TCVcv	37,5	6,3	6,3	9,4
Контр. TCB	/	/	/	162,5
Образец пациента № 2 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	89,5	31,6	5,3	0
42-TCVcv	42,1	10,5	0	0
22-TCVcv	15,8	5,3	0	0
Контр. TCB	/	/	/	94,7
Образец пациента № 3 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	76,7	35,0	1,7	0

42-TCVcv	13,3	0	0	0
22-TCVcv	3,3	0	0	0
Контр. TCB	/	/	/	86,7
Образец пациента № 4 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	93,9	51,5	9,1	6,1
42-TCVcv	9,1	0	0	0
22-TCVcv	15,2	15,2	0	0
Контр. TCB	/	/	/	127,3
Образец пациента № 5 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	100	91,4	62,9	20,0
42-TCVcv	71,4	34,3	22,9	11,4
22-TCVcv	20,0	22,9	14,3	11,4
Контр. TCB	/	/	/	85,7
Образец пациента № 6 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	55,6	22,2	6,7	4,4
42-TCVcv	35,6	6,7	4,4	4,4
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2
Контр. TCB	/	/	/	117,8
Образец пациента № 7 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	84,4	82,6	46,8	19,3

42-TCVcv	67,0	33,9	12,8	5,5
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2
Контр. TCB	/	/	/	106,4

Таблица 21. Значения IMAХ10 и IMAХ1 в отношении максимального ингибирования роста плазматических клеток ММ при 10 нМ IMAХ10 и ингибирования при 1 нМ IMAХ1 на основе негативных по пропидию йодиду жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспириатов костного мозга пациентов в присутствии анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток.

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

Пример 14. Т-клеточная активация Т-клеток костного мозга пациентов, индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (многопараметрическая проточная цитометрия)

Для оценки способности анти-BCMA/анти-CD3 антител TCB индуцировать активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток пациента с миеломой (т. е. инфильтрующих костный мозг Т-клеток (MIL)), образцы из соответствующих леченных, нелеченных и контрольных групп через 48 ч инкубации также окрашивали раствором с антителами для FACS, приготовленными на наборе антител, включавшем восемь маркеров: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. Затем образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре и получали данные и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Определяли активацию Т-клеток путем оценки отбором CD25,

CD69 и/или HLA-DR позитивной экспрессии по гейтам популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Затем измеряли процентные значения активации Т-клеток. На Фиг. 11 показана зависимость от концентрации повышенной регуляции CD69 и CD25 на инфильтрованных в костный мозг CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, взятых у пациентов с множественной миеломой. В табл. 22 обобщено увеличение экспрессии CD69 и CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 антителами ТСВ; данные для одного пациента.

Таблица 22. Т-клеточная активация аутологичных Т-клеток пациентов с миеломой, индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток в присутствии миеломных плазматических клеток костного мозга пациентов

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

22-TCBcv	12,34	11,52	5,23	4,89	4,90	7,5
Контрольное TCB	6,90	6,50	/	/	/	/
CD25+/CD8 T-клетки (%)	Концентрация анти-BCMA /анти-CD3 биспецифических антител T-клеток (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	9,79	6,560	0,42	0,13	0,12	0,12
42-TCBcv	2,20	2,231	0,42	0,14	0,08	0,12
22-TCBcv	3,57	4,110	0,65	0,10	0,08	0,12
Контрольное TCB	0,09	0,100	/	/	/	/

Пример 15. Увеличенное функционирование Т-клеток (продукция цитокинов) Т-клеток костного мозга пациентов, индуцированное анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (иммуноанализ на основе мультиплексированных гранул / проточная цитометрия)

Для оценки способности анти-BCMA/анти-CD3 антител TCB (83A10-TCBcv, 22-TCBcv and 42-TCBcv) индуцировать активацию Т-клеток и увеличенное функционирование CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, инфильтрирующих костный мозг пациентов с миеломой, отбирали супернатант из культуры соответствующих леченных, нелеченных и контрольных групп через 48 ч инкубации и измеряли содержание цитокинов и сериновых протеаз. Выполняли анализ с массивом цитокиновых гранул (CBA) на многоцветном проточном цитометре в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II для выявления цитокинов человека Th1/Th2 (BD № 551809) или комбинацию следующих комплектов CBA Flex: для человеческого гранзима В (BD № 560304), комплект Flex для человеческого IFN- γ (BD № 558269), комплект Flex для человеческого TNF- α (BD № 558273), комплект Flex для человеческого IL-10 (BD № 558274), комплект Flex для человеческого IL- 6 (BD № 558276), комплект Flex для человеческого IL-4 (BD № 558272), комплект Flex для человеческого IL-2 (BD № 558270).

Пример 16. Фармакокинетическое/фармакодинамическое (ФК/ФД) исследование на яванских макаках

Анти-BCMA/анти-CD3 антитело TCBcv может получить явное преимущество над другими биспецифическими антителами, такими как (scFV)₂ (например, привлекающим Т-клетки BCMAxCD3

биспецифическим активатором ViTE®, как описано в WO2013072415 и WO2013072406), благодаря намного более длительному периоду полувыведения/более низкому выведению *in vivo*, что может позволять выполнять ВВ или ПК введение дважды или раз в неделю по сравнению с очень коротким периодом полувыведения (scFV)₂ (например, от 1 до 4 часов), требующим введения посредством насоса, носимым пациентами в течение от недель до месяцев (Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8). Введение дважды или раз в неделю было бы намного более удобным для пациентов, а также нести намного меньший риск (например, отказ насоса, проблемы с катетером и т. д.).

а) Для проверки времени полупериода удаления/выведения анти-BCMA/анти-CD3 антитела 83A10-TCVscv *in vivo* в квалифицированных аккредитованных AAALAC ПИО проводили фармакокинетические (ФК) фармакодинамические (ФД) исследования с анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток (83A10-TCVscv, 22-TCVscv и 42-TCVscv). Биологически непримированных взрослых яванских макаков, возрастом около двух лет и весом приблизительно 3 кг, акклиматизировали в течение по меньшей мере 40 дней и отбирали на основе массы тела, клинических наблюдений и изучений клинической патологии. Идентифицировали животных по индивидуальным татуировкам и обозначенных цветом карточек на клетках. Все проводимые с животными процедуры (включая проживание, отслеживание здоровья, содержание, дозирование и т. д.) и этический пересмотр выполняли в соответствии с действующим в стране законодательством, соблюдающим Директиву по защите животных, используемых в биомедицинском исследовании. Животных случайным образом определяли в группу лечения на основе самой последней массы тела до испытания. После исключения животных с неприемлемыми показателями до испытаний применяли компьютерную программу в составе системы Pristima®, предназначенную для достижения равновесия применительно к значениям массы тела до испытаний, для исключения животных как с крайними значениями массы тела, так и рандомизации оставшихся животных в группе лечения. Животных распределяли в три группы лечения с применением 83A10-TCVscv (n=2 животных, т. е. 1 самка и 1 самец в группе) в дозе 0,003; 0,03 и 0,3 мг/кг. Животные получали однократную вв-инъекцию 83A10-TCVscv и отбирали образцы крови меньшей мере 0,8 мл в каждый момент времени из периферической вены для ФК-оценок в соответствии со следующим графиком отбора и процедур: до введения доз, через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения доз. Образцам крови давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200 g, +4 °C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) непосредственно хранили при -80 °C до последующего анализа. Образцы костного мозга для ФК-оценки также отбирали из бедренной кости под анестезией/обработкой анальгетиками в соответствии со следующим графиком отбора: до введения доз, через 96 и 336 ч после введения доз. Образцам костного мозга давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200 g, +4 °C). Полученный костный мозг (около 1 мл)

непосредственно хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до последующего анализа. Выполняют анализ и оценку ФК-данных. Выполняют стандартный анализ без компарментов с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, штат Массачусетс, США) или систему Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на Фиг. 12 и в табл. 23, концентрации 83A10-TCBcv в образцах сыворотки, собранных в различные моменты времени после ВВ инъекции, измеряли методом ELISA. В табл. 24 показаны концентрации 83A10-TCBcv в костном мозге, измеренные методом ELISA для каждой группы лечения (BLQ означает ниже уровня количественного определения).

Некоторая информация, относительно потенциального клинического применения биспецифического антитела в соответствии с изобретением, может быть взята из Фиг. 12, табл. 23 и табл. 24.

- В аспиратах костного мозга, взятых у пациентов с ММ, концентрации 1 нМ или 10 нМ TCB по данному изобретению индуцируют значительное или даже полное уничтожение плазматических клеток ММ; в дозе 0,03 мг/кг в интервале от проведения инъекции до 168 часов (7 дней) концентрация в плазме достигала приблизительно от 1 нМ до 4 нМ, что показывает хорошую обоснованность терапии раз в неделю дозами приблизительно 0,03 мг/кг (200 нг/мл соответствует приблизительно 1 нМ).
- На Фиг. 12 показано, что исследованный для ФК диапазон доз является в значительной степени линейным по дозе, что означает пропорциональность концентраций дозе – полезное свойство для клинической терапии.
- ММ представляет собой заболевание в основном локализованное в костном мозге. Концентрации 83A10-TCBcv, выявленные в костном мозге, близки к концентрациям в сыворотке (табл. 24), например, через 96 ч после инъекции концентрации в костном мозге измерены на уровне приблизительно 1 и 2 нМ. Это такие концентрации TCB по данному изобретению, при которых в аспиратах костного мозга, свежееотобранных у пациентов с ММ, наблюдали гибель плазматических клеток ММ. Снова продемонстрирована возможность для применения удобных интервалов дозирования, как раз в неделю.
- В пределах между 24 и 504 часами после инъекции, выведение в значительной степени происходит по зависимости первого порядка с периодом полувыведения приблизительно от 6 до 8 дней, снова показывая возможность, например, для дозирования раз в неделю.

Таблица 23. Концентрации 83A10-TCBcv в сыворотке после ВВ лечения яванских макак

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

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

Таблица 24. Концентрации 83A10-TCBcv в костном мозге после однократного ВВ лечения яванских макак

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

Фармакодинамические (ФД) измерения. Собирали образцы крови (моменты времени: до введения дозы, через 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения дозы) и образцы костного мозга (моменты времени: до введения дозы, 96 и 336 ч после введения дозы) в пробирки, содержащие 7,5 % КЗ EDTA для ФД-оценки методом проточной цитометрии для оценки влияния вв-введения 83A10-TCBcv в виде

однократной дозы на кровь и плазматические клетки костного мозга, В-клетки и Т-клетки. Применяли прямой метод иммунофлуоресцентного окрашивания поверхностных маркеров «лизис и промывка». Вкратце, инкубировали 100 мкл крови или костного мозга с двумя смесями антител, включающими CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 или CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8, в темноте в течение 30 мин + 4 °С. Для лизирования эритроцитов к образцу добавляли 2 мл лизирующего буферного раствора и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки собирали центрифугированием и промывали буферным раствором для окрашивания (ФСБ и 2 % фетальной бычьей сыворотки). До получения данных на цитометре в тот же день окрашенные образцы хранили охлажденными, защищенными от света. Получение данных FACS выполняли с помощью проточного цитометра Becton Dickinson, оборудованного лазерными линиями 488 и 635, BD FACS Canto II. Для сбора и анализа данных использовали программное обеспечение BD FACS Diva. Выполняли подсчет абсолютного числа клеток с помощью двойной платформы, на основе подсчета БКК, полученного на гематологическом анализаторе (ADVIA™ 120, Siemens). Как показано на Фиг. 13, у всех животных наблюдали перераспределение периферических Т-клеток после получения лечения однократной дозой 83A10-TCVcv, как показано по уменьшению количества циркулирующих Т-клеток. Как показано на Фиг. 14А, уже через 24 ч после лечения 0,3 мг/кг 83A10-TCVcv у получивших лечение животных наблюдали уменьшение плазматических клеточек крови (BCMA-позитивных клеток), при этом отсутствовало снижение общего количества В-клеток (BCMA-негативных клеток). На Фиг. 14б показана кинетика снижения плазматических клеточек в крови после лечения с помощью 0,3 мг/кг 83A10-TCVcv яванских макаков.

Образцы крови также обрабатывали для сбора плазмы для анализа цитокинов (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ) в соответствии со следующим графиком отбора: до введения доз, через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168 ч после введения доз. Образцы крови помещали в пластиковые пробирки, хранившиеся в ледяной бане, затем центрифугировали (по меньшей мере 10 мин, 1200 g, +4 °С). Полученную плазму непосредственно хранили при -80 °С до проведения анализа. Анализ на цитокины выполняют с помощью иммуноанализа на цитокины на основе мультиплексных гранул (Luminex Technology). Анализируют данные с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad): применяя пятипараметрическую модель логистической регрессии (5PL).

б) В дополнительном исследовании яванских макаков лечили 42-TCVcv или 22-TCVcv. Животные (n=2/группу) получали одну ВВ (0,01; 0,1 и 1,0 мг/кг) или ПК (0,01 и 0,1 мг/кг) инъекцию 42-TCVcv или одну ВВ инъекцию 22-TCVcv (0,1 мг/кг). Отбирают образцы крови и костного мозга в моменты времени, следуя определенному графику отбора, и обрабатывают соответственно для ФК- и ФД-измерения (иммунофенотипирование и продукция цитокинов).

Животные получали однократную ВВ или ПК инъекцию 42-ТСВсv или 22-ТСВсv (только ВВ) и отбирали образцы крови в каждый момент времени из периферической вены для ФК-оценок в соответствии со следующим графиком отбора и процедур: до введения доз, через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения доз. Образцам крови давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200 g, +4 °C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) непосредственно хранили при -80 °C до последующего анализа. Образцы костного мозга для ФК-оценки также отбирали из бедренной кости под анестезией/обработкой анальгетиками в соответствии со следующим графиком отбора: до введения доз, через 96 и 336 ч после введения доз. Образцам костного мозга давали свернуться в пробирках для отделения сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200 g, +4 °C). Полученный костный мозг (около 1 мл) непосредственно хранили при -80 °C до последующего анализа. Выполняли анализ и оценку ФК-данных. Выполняли стандартный анализ без компартментов с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, штат Массачусетс, США) или систему Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на Фиг. 19 и в табл. 24А-Д, концентрации 42-ТСВсv в образцах сыворотки и костного мозга, собранных в различные моменты времени после ВВ или ПК инъекции, измеряли методом ELISA. Диапазон эффективных концентраций 42-ТСВсv в аспиратах костного мозга пациента с множественной миеломой соответствовал от 10 пм до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ. BLQ, ниже уровня количественного определения; н/и, недостоверное измерение.

Таблица 24А. Концентрации 42-ТСВсv в сыворотке после ВВ лечения яванских макак

42-ТСВсv						
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг, ВВ		0,1 мг/кг, ВВ		1,0 мг/кг, ВВ	
	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка
До введения дозы	BLQ	BLQ	н/и	BLQ	BLQ	BLQ
30 мин	468,57	613,44	4720,33	4506,64	41939,31	32677,23
90 мин	333,09	427,16	4284,66	3214,61	30889,73	103925,73
180 мин	392,37	422,36	4336,89	2865,36	29201,69	36157,78
7 ч	421,96	356,34	4028,47	3070,84	25064,81	29962,62

24 ч	242,64	305,74	2996,24	2321,66	19365,86	23656,65
48 ч	н/и	192,97	2595,62	1781,91	20539,59	13523,68
96 ч	128,50	148,02	2153,34	1277,02	13147,09	12755,58
168 ч	51,13	72,64	1388,24	948,31	6189,79	3952,05
336 ч	27,68	13,03	195,51	190,87	5337,85	54,15
504 ч	18,17	8,04	275,93	13,96	3678,69	37,88

Таблица 24В. Концентрации 42-ТСВсv в костном мозге после однократного ВВ лечения яванских макак

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

Таблица 24С. Концентрации 42-ТСВсv в сыворотке после ПК лечения яванских макак

42-ТСВсv				
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг ПК		0,1 мг/кг ПК	
	Самец	Самка	Самец	Самка
До введения дозы	4,76	12,41	BLQ	BLQ
30 мин	8,25	12,51	25,11	14,62

90 мин	16,38	22,71	140,73	145,39
180 мин	23,75	48,51	334,95	269,66
7 ч	37,46	63,48	836,86	565,10
24 ч	68,15	115,31	2100,42	904,22
48 ч	116,63	118,03	1956,60	1111,06
96 ч	150,77	120,62	1810,13	1817,52
168 ч	106,28	98,64	1192,65	1653,26
336 ч	67,02	46,21	482,39	571,04
504 ч	25,69	31,99	4,08	83,91

Таблица 24D. Концентрации 42-ТСВсv в костном мозге после однократного ПК лечения яванских макак

42-ТСВсv				
Конц. (нг/мл)	0,01 мг/кг ПК		0,1 мг/кг ПК	
	Самка	Самец	Самка	Самка
До введения дозы			BLQ	BLQ
96 ч	5,59	10,70	1064,66	1066,79
336 ч	29,35	48,78	518,40	906,48

Результаты из табл. 24А и 24С показывают привлекательный профиль концентраций в сыворотке, подходящий для лечения 42-ТСВсv один раз в неделю или даже один раз в две недели. Определяли площадь под кривой АУС для концентраций в сыворотке после ВВ и ПК введения, сравнение значений АУС показало высокую биодоступность близкую к 100 % при ПК инъекции 42-ТСВсv. В дополнение к этому, результаты показали, что концентрация 42-ТСВсv в костном мозге является очень сходной с концентрациями в сыворотке 42-ТСВсv. Концентрации 42-ТСВсv в сыворотке могут хорошо представлять собой концентрации 42-ТСВсv, присутствующие в костном мозге, т. е. в основном месте, обогащенном миеломными опухолевыми клетками.

Фармакодинамические (ФД) измерения являются ценной информацией для подтверждения ФК-измерений. Выполняли дополнительные ФД-анализы. CD20⁺ В-клетки крови яванского макака также экспрессируют ВСМА на клеточной поверхности и значительно более распространены (большее абсолютное число), чем плазматические клетки в крови. В качестве надежного фармакодинамического воздействия использовали деплетирование В-клеток крови анти-ВСМА/анти-CD3 антителами ТСВсv и для сравнения эффективности *in vivo* между 83A10-ТСВсv, 42-ТСВсv и 22-ТСВсv. Рассчитывали абсолютные числа В-клеток на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета WBC, полученного с помощью гематологического анализатора, и измеренных в следующие моменты времени: до введения доз, через 24 ч, 48 ч, 96 ч и 196 ч после 10-минутной ВВ инфузии. Процентдеплетирования В-клеток рассчитывали в следующем порядке:

$$= \frac{[\text{абсолютное число В-клеток до введения доз}] - [\text{абсолютное число В-клеток в момент времени}]}{[\text{абсолютное число В-клеток до введения доз}] * 100}$$

Таблица 24Е. Фармакодинамические эффекты анти-ВСМА/анти-CD3 антител ТСВсv: деплетирование В-клеток

Время после ВВ инъекции (часы)	Деплетирование В-клеток относ. момента до введ. дозы (%)		
	83A10-ТСВсv 0,3 мг/кг (n=2)	42-ТСВсv 0,1 мг/кг (n=2)	22-ТСВсv 0,1 мг/кг (n=2)
24 ч	19,9 ± 0,21	91,4 ± 3,8	77,8 ± 3,7
48 ч	11,9 ± 17,6	88,8 ± 3,9	61,5 ± 9,8
96 ч	5,0 ± 10,8	93,0 ± 7,2	89,2 ± 4,8
168 ч	-0,23 ± 61,4	96,6 ± 3,5	91,9 ± 3,9

В отношении индукции деплетирования экспрессирующих ВСМА В-клеток у яванских макаков 42-ТСВсv и 22-ТСВсv являются более активными чем 83A10-ТСВсv, после ВВ инъекции однократной дозы (см. табл. 24Е). Поскольку три молекулы обладают одинаковой молекулярной структурой и связующим CD3 фрагментом, отличие в эффективности у яванских макаков может главным образом обуславливаться соответствующим ВСМА-антителом.

Для подтверждения того, что деплетирование экспрессирующих ВСМА В-клеток у яванских макак после ВВ инъекции является результатом механистических фармакодинамических эффектов анти-ВСМА/анти-CD3 антител ТСВсv, измеряли увеличение активированных CD8⁺ цитотоксических Т-клеток (т. е. эффекторных клеток) в костном мозге, обогащенном ВСМА-позитивными клетками (т. е. клетками-мишенями) через 4 дня (96 ч) и 3 недели (336 ч) после ВВ инъекции. Рассчитывали абсолютные числа CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-клеток на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета WBC, полученного с помощью гематологического анализатора.

Таблица 24F. Фармакодинамические эффекты анти-ВСМА/анти-CD3 антител ТСВсv Увеличение CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-клеток

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

В отношении индукции активации Т-клеток у яванских макак 42-ТСВсv и 22-ТСВсv являются более активными чем 83A10-ТСВсv, после ВВ инъекции однократной дозы (см. табл. 24F). Поскольку три молекулы обладают одинаковой молекулярной структурой и связующим CD3 фрагментом, отличие в фармакодинамических эффектах у яванских макак может главным образом обуславливаться соответствующим ВСМА-антителом. Данные результаты указывают на то, что деплетирование ВСМА-позитивных В-клеток в костном мозге и в крови является наиболее вероятным результатом активации цитотоксических Т-клеток, индуцированных анти-ВСМА/анти-CD3 антителами ТСВсv.

Пример 17. Противоопухолевая активность, индуцированная анти-ВСМА/анти-CD3 биспецифическим антителом Т-клеток в модели ксенотрансплантата миеломы H929 человека с использованием МКПК-гуманизированных NOG-мышей

Fc-содержащие анти-ВСМА/анти-CD3 антитела ТСВсv с длительным полупериодом выведения могли бы быть более эффективными, чем биспецифические антитела на основе (scFv)₂, такие как ВСМА50-BiTE®, введенные в эквимоллярных дозах по схеме раз в неделю. Сравнивали влияние *in vivo* 83A10-ТСВсv и ВСМА50-BiTE® (как описано в WO2013072415 и WO2013072406) и оценивали в модели ксенотрансплантата H929 миеломы человека на МКПК-гуманизированных NOG-мышьях. NOG-мышья

подходят в качестве моделей гуманизированных мышей, поскольку у них полностью отсутствуют иммунные клетки, включая резидентные популяции НК-клеток, и поэтому они более перmissive для прививания опухолей ксеногенных клеток человека (Ito et al. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 53-76). Вкратце, на день 0 (d0) исследования подкожно (ПК) инъецировали 5×10^6 миеломных клеток линии NCI-H929 человека (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) в 100 мкл среды RPMI-1640, содержащей 50:50 матригеля (BD Biosciences, Франция) в правую область спины иммунодефицитных самок мышей NOD/Shi-scid IL2г-гамма (нуль) (NOG) возрастом 8-10 недель (Taconic, Ry, Дания). За от двадцать четырех до 72 часов до ПК имплантации опухолевых клеток H929 все мыши получали облучение всего тела γ -источником (1,44 Грей, ^{60}Co , BioMer, г. Бретеньер, Франция). На сутки 15 (d15) NOG-мыши получали однократную внутрибрюшинную (ВБ) инъекцию 2×10^7 МКПК человека (в 500 мкл ФСБ 1X pH 7,4). Выполняли определение характеристик МКПК человека иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Затем мышей тщательно случайным образом распределяли на различные группы лечения и контрольные группы ($n=9$ /группу) с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция) и выполняли статистическое исследование (дисперсионный анализ) для исследования гомогенности между группами. Лечение антителами начинали на день 19 (d19), т. е. 19 дней после ПК инъекции опухолевых клеток H929, когда объем опухоли достиг 100-150 мм³ у всех мышей со средним объемом опухолей 300 ± 161 мм³ для леченной носителем контрольной группы, 315 ± 148 мм³ для получавшей лечение 2,6 нМ/кг контрольного ТСВ группы, 293 ± 135 мм³ для получавшей 2,6 нМ/кг 83A10-ТСВscv группы и 307 ± 138 мм³ для получавшей 2,6 нМ/кг ВСМА50-(scFv)₂ (ВСМА50-BiTE®) группы. Схема лечения антителами ТСВ была основана на раннее полученных с 83A10-ТСВscv фармакокинетических результатах и состояла из еженедельного ВВ введения в течение до 3 недель (т. е. всего 3 инъекции антитела ТСВ). Через четыре дня после восстановления мышам-хозяевам с МКПК человека (d19) посредством инъекции в хвостовую вену вводили первую дозу анти-ВСМА/анти-CD3 антитела 83A10-ТСВscv (2,6 нМ/кг, соответственно, 0,5 мг/кг). У мышей из всех леченных 83A10-ТСВscv и контрольным ТСВscv групп, отбирали образцы крови пункцией яремной/подчелюстной вены (под анестезией) за 1 ч до каждого лечения, 2 ч до второго лечения и при его завершении. Образцы крови немедленно переносили в пробирки, содержащие активатор свертывания (пробирки Т MG, темно-красная крышка, Sarijest®, Tegumo®). Пробирки оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин для обеспечения свертывания. Затем пробирки центрифугировали при 1300 g в течение 5 мин для отделения сгустка/сыворотки. Готовили аликвоты сыворотки быстрой заморозкой в жидком азоте и хранили их при -80 °C до последующего анализа. Во время исследования измеряли объем опухолей (TV) штангенциркулем и оценивали прогрессирование путем сравнения TV между группами. Процентное значения роста опухоли, определенное как TG, определяли путем расчета $TG (\%) = 100 \times (\text{медиана TV анализируемой группы}) / (\text{медиана TV получавшей носитель контрольной группы})$. По этической причине мышей подвергали эвтаназии, когда TV достигало по меньшей мере 2000 мм³. На Фиг. 15 показано значение TV каждой отдельной

мыши в экспериментальной группе: (А) контрольные группы, включали получающую контрольный носитель (сплошная линия) и контрольный ТСВ (штриховая линия), (В) 83А10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) группу и (С) ВСМА50-ВіТЕ® (2,6 нМ/кг). В получавшей 83А10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) группе 6 из 9 мышей (67 %) имели опухоли, регрессировавшие ниже значений TV, зафиксированных на d19, т. е. первое лечения с помощью ТСВ, а регрессия опухолей сохранялась до завершения исследования. У 3 мышей, в получавшей лечение 83А10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) группе, для которых не удалось показать регрессию опухоли, были значения TV равные, соответственно, 376, 402 и 522 мм³ на d19. В противоположность этому, ни у одной из 9 мышей (0 %), которых лечили эквимоларной дозой ВСМА50-ВіТЕ® (2,6 нМ/кг) по еженедельной схеме в течение 3 недель, имели регрессию опухолей в любой момент времени. В табл. 25 показано прогрессирование объемов опухолей с течением времени во всех экспериментальных группах. Процентное значения роста опухолей рассчитывали в течение от d19 до d43 и сравнивали между получавшими 83А10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) и ВСМА50-ВіТЕ® (2,6 нМ/кг) группами (Фиг. 16). Данные результаты демонстрируют, что значение TG (%) согласованно и значимо снижается у получавшей 83А10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) группе, а также TG (%) всегда ниже по сравнению с ВСМА50-ВіТЕ® (2,6 нМ/кг). В табл. 26 показана медиана объема опухоли (TV) и процент роста опухоли (TG (%)) в дни от 19 до 43. Общие результаты ясно демонстрируют, что 83А10-ТСВсv превосходит ВСМА50-ВіТЕ® по индукции противоопухолевой активности *in vivo*, когда лечение производится в эквимоларной дозе по схеме раз в неделю в течение 3 недель.

Таблица 25. Прогрессирование объемов опухолей с течением времени у мышей из контрольной группы, получавшей носитель, и мышей, леченных эквимоларными дозами контрольного ТСВ, 83А10-ТСВсv и ВСМА50-(scFv)₂ (ВСМА50-ВіТЕ®)

Объем опухоли (мм ³)	Группа А контрольного носителя										
	А1	А2	А3	А4	А5	А6	А7	А8	А9	Среднее	СО
День 5	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
День 8	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
День 12	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
День 15	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
День 19	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
День 23	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
День 27	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
День 30	1870	1129	x	419,2	867	1060	1368	673	1331	1090	450

День 34	х	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
День 37		2140		2043	1309	2017	2394	1267	х	1862	464
40 день		х		х	1592	х	х	1346		1469	174
День 43					1548			1994		1771	314
День 47					х			х			
День 51											

Объем опухоли (мм ³)	Группа В 2,6 нМ/кг контрольного ТСВ										
	В1	В2	В3	В4	В5	В6	В7	В8	В9	Среднее	СО
День 5	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
День 8	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
День 12	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
День 15	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
День 19	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
День 23	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
День 27	924	1252	232	780	768	1009	915	606	630	791	289
День 30	1191	1714	326	867	1230	1349	1118	817	783	1044	398
День 34	1684	х	592	1466	1660	1954	1765	1180	576	1359	529
День 37	2522		597	1735	1105	х	х	1402	861	1370	691
40 день	х		978	2388	1952			2277	1365	1792	604
День 43			1302	х	х			х	1895	1599	419
День 47			2346						2373	2359	19
День 51			х						х		

Объем опухол и (мм ³)	Группа С 2,6 нМ/кг 83А10-ТСВсв										
	С1	С2	С3	С4	С5	С6	С7	С8	С9	Средн ее	СО
День 5	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
День 8	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
День 12	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12

Таблица 26. Медиана объема опухоли (TV) и процент роста опухоли (TG (%)) в дни от 19 до 43: 83A10-TCVscv по сравнению с BCMA50-BiTE®.

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

Пример 18. Противоопухолевая активность, индуцированная анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток в модели ксенотрансплантата RPMI-8226 миеломы человека у МКПК-гуманизированных NOG-мышей

В альтернативном варианте для линии клеток H929 миеломы, в качестве опухолевого ксенотранспланта использовали линию клеток миеломы человека RPMI-8226, для которой уровни экспрессии поверхностного BCMA ниже, чем H929 и более репрезентативны по выявляемому уровню на первичных миеломных клетках. Вкратце, на день 0 (d0) исследования подкожно (ПК) инъецировали 10×10^6 - 20×10^6 миеломных клеток линии RPMI-8226 человека (ATCC® CCL-155™) в растворе 200 мкл 0,9 % NaCl, содержащем 50:50 матригеля (BD Biosciences, Франция) в правую область спины иммунодефицитных самок мышей NOD/Shi-scid IL2r-гамма (нуль) (NOG) возрастом 8-10 недель (Taconic, Ру, Дания). За от двадцать четырех до 72 часов до ПК имплантации линии клеток RPMI-8226 все мыши получали облучение всего тела γ -источником (1,44 Грей, ^{60}Co , BioMer, г. Бретеньер,

Франция). Мыши NOG получают однократную внутривенную (ВВ) инъекцию 2×10^7 МКПК человека (в 500 мкл ФСБ IX pH 7,4) один раз между днем 9 (d9) и днем 45 (d45), как только объемы опухолей достигали по меньшей мере 100-150 мм³. Выполняют определение характеристик МКПК человека иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Затем мышей тщательно случайным образом распределяют на различные группы лечения и контрольные группы (n=9/группу) с использованием программного обеспечения Vivo manager[®] (Biosystemes, г. Кутернон, Франция) и выполняют статистическое исследование (дисперсионный анализ) для исследования гомогенности между группами. Лечение антителами начинается по меньшей мере от 24 ч до 48 ч после ВВ инъекции МКПК человека, а затем объем опухоли достигает по меньшей мере 100-150 мм³ у всех мышей. Схема лечения антителами ТСВ основывается на предыдущих фармакокинетических результатах и состоит из ВВ введения один или два раза в неделю через хвостовую вену в течение до 3 недель (т. е. всего 3 инъекции антитела ТСВ). Образцы крови собирают пункцией яремной/подчелюстной вены (под анестезией) за 1 ч до каждого лечения, 2 ч до второго лечения и при его завершении. Образцы крови немедленно переносят в пробирки, содержащие активатор свертывания (пробирки Т MG, темно-красная крышка, Сариject[®], Tegimo[®]). Пробирки оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин для обеспечения свертывания. Затем пробирки центрифугируют при 1300 g в течение 5 мин для отделения сгустка/сыворотки. Готовят аликвоты сыворотки быстрой заморозкой в жидком азоте и хранят их при -80 °С до последующего анализа. Во время исследования измеряют объем опухоли (TV) штангенциркулем и оценивают прогрессирование путем сравнения TV между группами. Процентное значения роста опухоли, определенное как ингибирование TG, определяют путем расчета $TG (\%) = 100 \times (\text{медиана TV анализируемой группы}) / (\text{медиана TV получавшей носитель контрольной группы})$.

Сначала выполняли разработку модели ксенотрансплантата RPMI-8226 миеломы человека у МКПК-гуманизированных NOG-мышей для подтверждения, что модель ксенотрансплантата подходила для анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток. На день 0 NOG-мышам инъецировали BCMA^{низк}-экспрессирующие клетки RPMI-8226 MM. На день 22 ВВ инъецировали МКПК человека, а Т-клетки человека в крови можно выявлять через одну неделю (данные не показаны). Как описано на Фиг. 20, измеряли рост опухоли и массу тела до дня 50. Неожиданно и к сожалению, эта модель ксенотрансплантата оказалась нестабильной для исследования противоопухолевой активности анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток по следующим причинам: 1) ксенотрансплантат RPMI-8226 миеломы человека не смог согласованно расти в МКПК-гуманизированных NOG-мышях; 2) МКПК-гуманизированные NOG-мыши, которым трансплантировали ксенотрансплантат RPMI-8226 начинали терять массу тела вскоре после ВВ инъекции МКПК человека – признак реакции «трансплантат против хозяина». Этим мышам подвергали эвтаназии по этическим причинам; 3) при умерщвлении мыши-хозяина наблюдали потерю экспрессии BCMA в ксенотрансплантате опухоли после ПК инъекции.

Пример 19. Перенаправленная цитотоксичность Т-клеток для плазматических клеткок из мононуклеарных клеток периферической крови или аспириатов костного мозга пациента с плазмоклеточным лейкозом (PCL) в присутствии аутологических Т-клеток, индуцированных анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии

Плазмоклеточный лейкоз (PCL) представляет собой лейкемический вариант миеломы, возникающий либо *de novo*, либо из предварительно существующей клинически проявленной множественной миеломы (ММ). Существующие в данное время способы лечения являются скорее ограниченными и в основном состоят из применения комбинаций лекарственных средств против ММ и химиотерапии. До настоящего времени не было явным образом зарегистрировано терапии для этой в высшей степени агрессивного и смертоносного заболевания. BCMA играет существенную роль в выживании нормальных плазматических клеткок и анти-BCMA/анти-CD3 биспецифические антитела Т-клеток можно применять в соответствии с изобретением для лечения плазмоклеточного лейкоза у пациента, страдающего от указанного заболевания. Выделяют свежееотобранные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) из образцов пациентов с плазмоклеточным лейкозом, содержащих > 80 % плазматических клеткок при высоких лейкоцитарных числа, на градиенте плотности с использованием Фиколла или другими сравнимыми методами и инкубируют в течение 24 ч или 48 ч с концентрациями анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток или контрольных антител от 0,1 до 30 нМ при 37 °С в атмосфере увлажненного воздуха. В качестве образцов также можно использовать аспириаты цельного костного мозга, взятых у пациентов с плазмоклеточным лейкозом. Каждую точку дозы исследуют в трех повторах. Определяли апоптоз методом окрашивания аннексина/пропидия йодида целой популяции и CD138-позитивных клеткок на FACSCalibur с использованием программного обеспечения (BD). Жизнеспособность плазматических клеткок и МКПК целой популяции исследовали двойным -окрашиванием пропидием йодидом/CD138- ФИТЦ с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Средние значения нормализуют по среднему из трех повторов к соответствующему контролю со средой (MC). Для статистического анализа используют однопараметрический t-тест. Максимальное ингибирование роста клеткок PCL при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, представлены в виде процента по отношению к контролю со средой. Измеряют также максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 или 30 нМ) по сравнению с контрольной средой. Расчеты выполняют с использованием R 3.1.19, а также Bioconductor 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Влияние считается статистически значимым, если значение P- его соответствующего статистического критерия составляет <5 % (*), <1 % (**), или <0,1 % (***). Экспрессию BCMA также измеряют на CD138⁺ плазматических клетках МКПК

из образцов, взятых у пациентов с плазмноклеточным лейкозом, а также определяют соотношение эффекторных клеток и опухолевых клеток (Е:Т). Как показано на Фиг. 20, данные результаты ясно показывают, что существовала значимо пониженная выживаемость плазматических лейкозных клеток костного мозга при действии 42-ТСВсv (т. е. больше лизиса плазматических лейкозных клеток костного мозга) в двух образцах, взятых у пациентов с плазмноклеточным лейкозом, по сравнению с контролем со средой. В табл. 27 продемонстрировано процент максимального ингибирования плазматических лейкозных клеток из аспиратов костного мозга или периферической крови пациентов, индуцированных 10 нМ (IMAX10) и 1 нМ (IMAX1) анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток по сравнению с контролем со средой. Данные результаты демонстрируют, что 42-ТСВсv является очень активным для индукции гибели плазматических лейкозных клеток костного мозга пациентов. Несмотря на специфический лизис плазматических лейкозных клеток костного мозга анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток и наблюдаемый в образцах костного мозга пациента (пациент 1 с PCL), в соответствующих образцах микроокружение костного мозга (BMME) не подвергалось воздействию (данные не показаны).

Таблица 27. Значения IMAX10 и IMAX1 в отношении максимального ингибирования роста плазматических клеток плазмноклеточного лейкоза при 10 нМ (IMAX10) и ингибирования при 1 нМ (IMAX1) на основе негативных по пропидию йодиду жизнеспособных миеломных плазматических лейкозных клеток из аспиратов костного мозга пациентов в присутствии анти-BCMA/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток.

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

Пример 20. Перенаправленная цитотоксичность Т-клеток для плазматических клеток костного мозга, взятых у пациента с AL-амилоидозом в присутствии аутологических Т-клеток, индуцированных анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическими антителами Т-клеток, как измерено методом проточной цитометрии

AL-амилоидоз представляет собой редкое заболевание, вызываемое нарушениями в костном мозге, которое поражает людей возрастом 50-80 лет, а две третьих пациентов являются мужчинами. AL-амилоидоз выражается аномальной продукцией белка антител / иммуноглобулинов плазматическими

клетками. При AL-амилоидозе легкие цепи (LC) антитела являются неправильно уложенными, а аномальные белки LC с неправильной укладкой приводят к образованию амилоида. Эти неправильно уложенные амилоидные белки откладываются внутри и вокруг тканей, нервов и органов. Так как амилоид накапливается в органе, нерве или ткани, то он постепенно вызывает повреждение и влияет на их функционирование. У пациентов с AL-амилоидозом часто поражается более одного органа. Поскольку ВСМА играет существенную роль в выживании нормальных плазматических клеток, то в высшей степени обосновано оценить влияние анти-ВСМА/анти-CD3 биспецифических антител Т-клеток для уничтожения плазматических клеток при AL-амилоидозе. Свежеотобранные образцы/аспираты цельного костного мозга пациентов с AL-амилоидозом подвергали либо непосредственному действию анти-ВСМА/анти-CD3 биспецифических антител ТСВ, либо окрашивали с помощью магнитных микрогранул CD138 (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS и собирали фракции с достаточным количеством оставшихся плазматических клеток AL-амилоидоза, обычно используемых в дополнительных экспериментах в количестве >4 %. В 24-луночных планшетах инкубируют и культивируют 500000 клеток/луночку в течение 48 часов. К соответствующим лункам добавляют разведения анти-ВСМА/анти-CD3 антител ТСВ и контрольных антител до конечной концентрации ТСВ от 0,1 пМ до 30 нМ. Каждую точку дозы исследуют в трех повторах. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследуют двойным -окрашиванием пропидием йодидом/CD138-ФИТЦ с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Средние значения нормализуют по среднему из трех повторов к соответствующему контролю со средой (МС). Для статистического анализа используют однопараметрический t-тест. Максимальное ингибирование роста клеток PCL при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, представлены в виде процента по отношению к контролю со средой. Измеряют также максимальное ингибирование контрольного антитела ТСВ (10 или 30 нМ) по сравнению с контрольной средой. Расчеты выполняют с использованием R 3.1.19, а также Bioconductor 2.13.10, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Влияние считается статистически значимым, если значение P- его соответствующего статистического критерия составляет <5 % (*), <1 % (**) или <0,1 % (***). Экспрессию ВСМА также измеряют на CD138⁺ плазматических клетках костного мозга из образцов, взятых у пациентов с AL-амилоидозом, а также определяют соотношение эффекторных клеток и опухолевых клеток (E:T).

Формула изобретения

1. Мультиспецифическое антитело, специфически связывающееся с антигеном созревания В-клеток (BCMA), при этом мультиспецифическое антитело содержит:

a) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 27, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 28 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

b) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 25, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 26, CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

c) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 23, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 24 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

d) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 29, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 30, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

e) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 34; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 35, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20; или

f) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 36; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 37, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20.

2. Мультиспецифическое антитело по п. 1, при этом мультиспецифическое антитело специфически связывается с BCMA и CD3.

3. Мультиспецифическое антитело по п. 2, при этом мультиспецифическое антитело содержит CD3 связывающий домен, содержащий CDR1H-участок с SEQ ID NO: 1, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 2, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 3, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 4, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 5 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 6.

4. Мультиспецифическое антитело по п. 3, в котором CD3 связывающий домен содержит VH-участок с SEQ ID NO: 7 и VL-участок с SEQ ID NO: 8.

5. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, при этом мультиспецифическое антитело представляет собой триспецифическое антитело.

6. Антигенсвязывающий домен антитела, специфический связывающийся с антигеном созревания В-клеток (BCMA), где антигенсвязывающий домен содержит:

a) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 27, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 28 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

b) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 25, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 26, CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

c) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 23, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 24 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

d) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 29, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 30, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

e) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 34; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 35, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20; или

f) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 36; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 37, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20.

7. Антигенсвязывающий домен по п. 6, при этом антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv.

8. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-5 или антигенсвязывающий домен по п. 6 или 7, где мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий домен содержит:

a) VH-участок с SEQ ID NO: 10 и VL-участок с SEQ ID NO: 14;

b) VH-участок с SEQ ID NO: 10 и VL-участок с SEQ ID NO: 13;

c) VH-участок с SEQ ID NO: 10 и VL-участок с SEQ ID NO: 12;

d) VH-участок с SEQ ID NO: 38 и VL-участок с SEQ ID NO: 12;

e) VH-участок с SEQ ID NO: 39 и VL-участок с SEQ ID NO: 12; или

f) VH-участок с SEQ ID NO: 40 и VL-участок с SEQ ID NO: 12.

9. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пп. 1-5 или 8, или антигенсвязывающего домена по любому из пп. 6-8, включающий этапы:

a) трансформирования клетки-хозяина векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего домена,

b) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез указанной молекулы антитела; и

c) выделения указанной молекулы антитела из указанной культуры.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-5 или 8 или антигенсвязывающий домен по любому из пп. 6-8 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

11. Применение фармацевтической композиции по п. 10 в качестве лекарственного средства.

12. Применение фармацевтической композиции по п. 10 для лечения нарушений, связанных с плазматическими клетками.

13. Применение фармацевтической композиции по п. 10 при лечении множественной миеломы, системной красной волчанки, плазмоклеточного лейкоза, амилоидоза легкой цепи (AL-амилоидоза), опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата, острого опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата, хронического опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата или хронического повреждения аллотрансплантата.

14. Способ лечения нарушений, связанных с плазматическими клетками, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 10 пациенту, нуждающемуся в этом.

15. Способ лечения множественной миеломы, системной красной волчанки, плазмоклеточного лейкоза, амилоидоза легкой цепи (AL-амилоидоза), опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата, острого опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата,

хронического опосредованного антителами отторжения аллотрансплантата или хронического повреждения аллотрансплантата, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.10 пациенту, нуждающемуся в этом.

16. Клетка-хозяин, содержащая векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мультиспецифическое антитело в соответствии с любым одним из пп. 1-6 или 8 или антигенсвязывающий домен по любому из пп. 6-8.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором антитело специфически связывается с антигеном созревания В-клеток (BCMA) и содержит:

а) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 27, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 28 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

б) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 25, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 26, CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

в) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 21, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 22, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 23, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 24 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

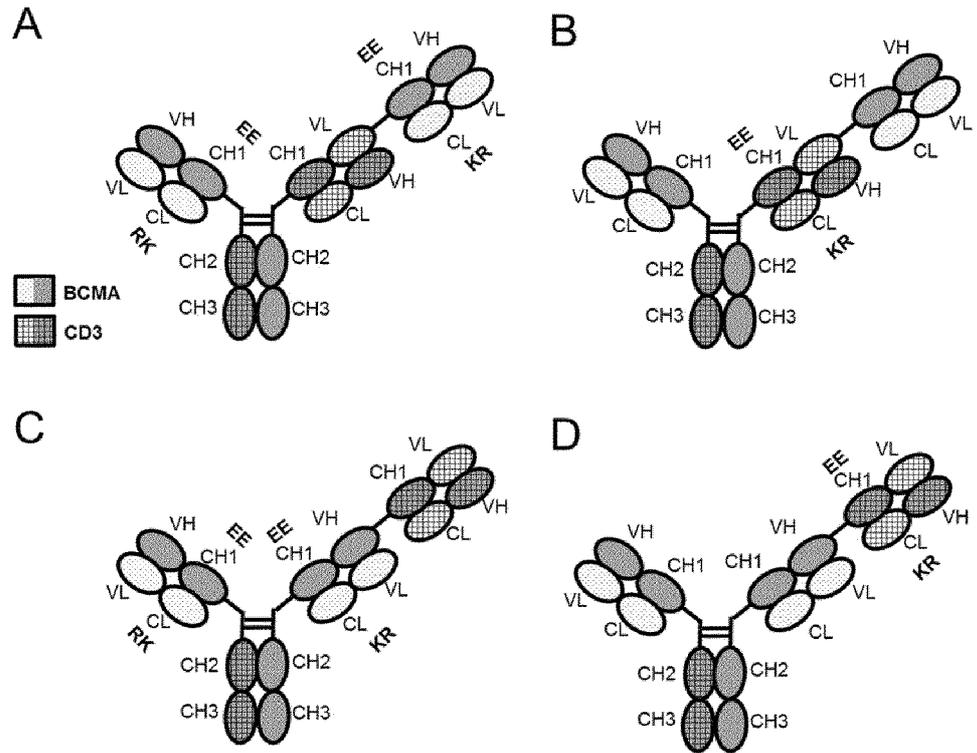
г) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 29, CDR2H-участок с SEQ ID NO: 30, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20;

д) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 34; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 35, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20; или

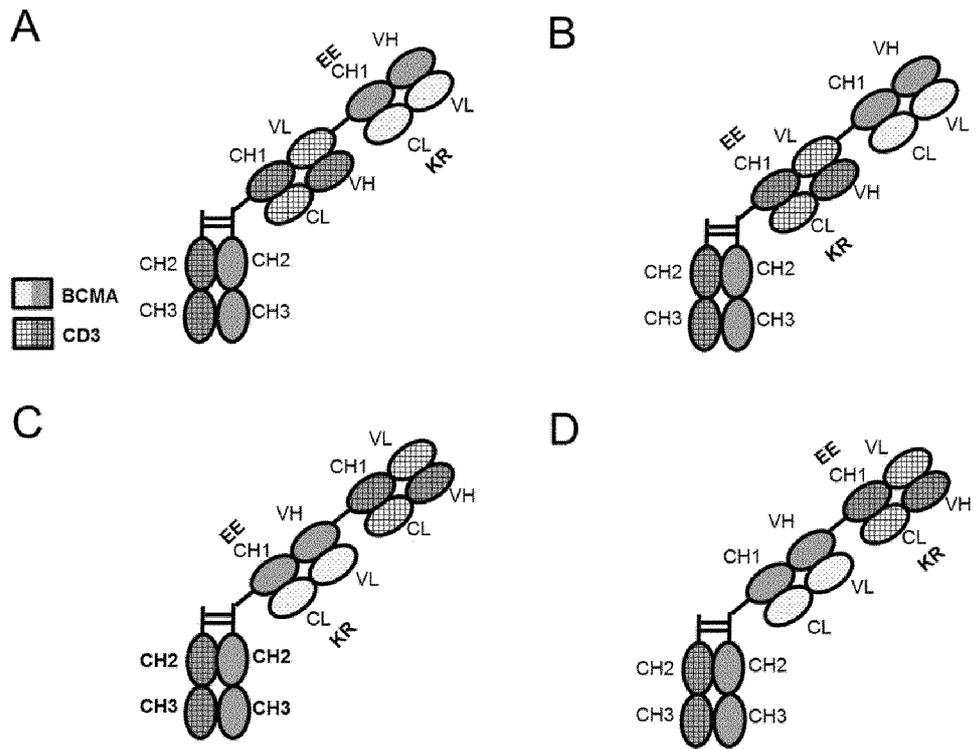
е) CDR1H-участок с SEQ ID NO: 36; CDR2H-участок с SEQ ID NO: 37, CDR3H-участок с SEQ ID NO: 17, CDR1L-участок с SEQ ID NO: 31, CDR2L-участок с SEQ ID NO: 32 и CDR3L-участок с SEQ ID NO: 20,

необязательно, где антитело конъюгировано с терапевтическим средством, цитотоксическим средством или радиоактивной меткой.

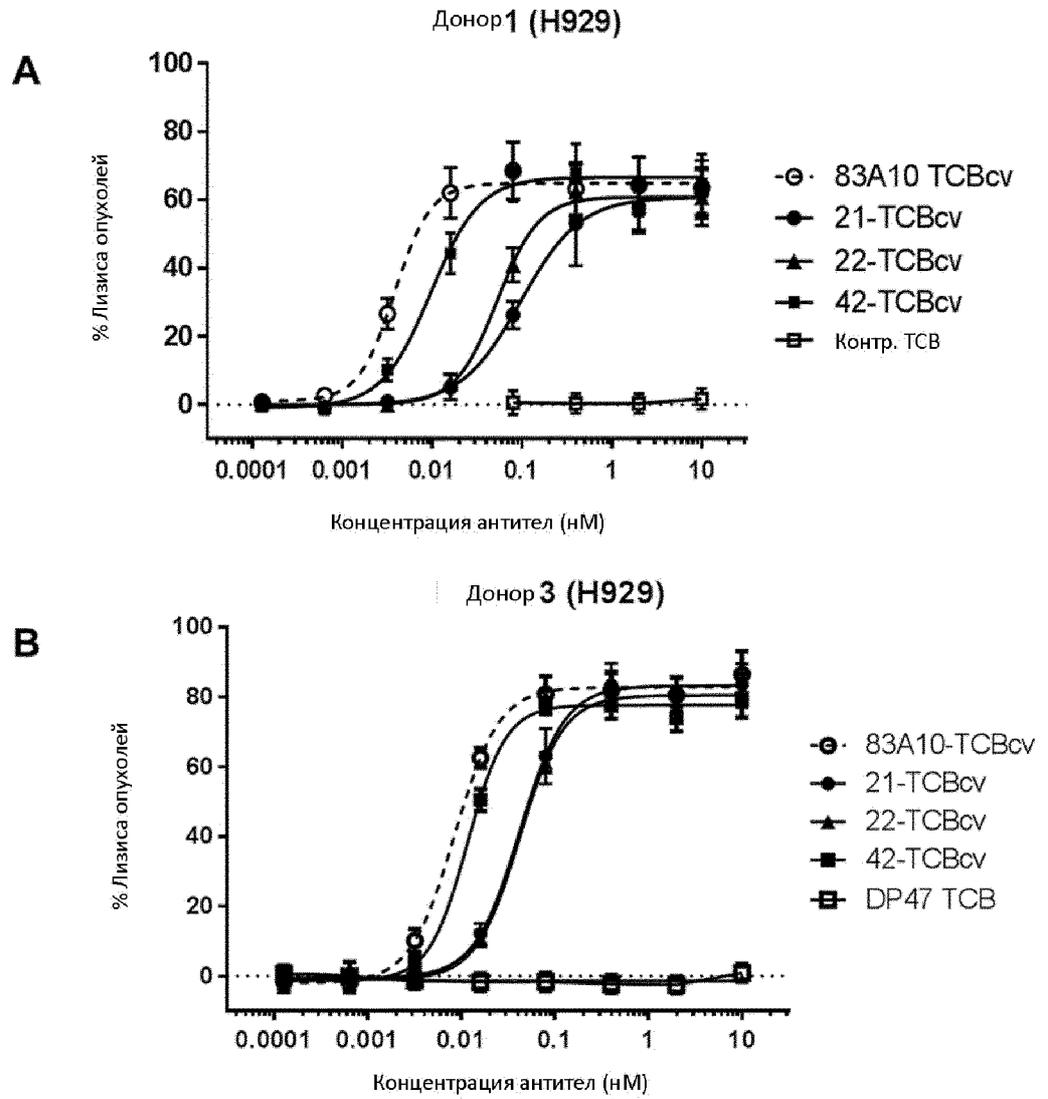
Фиг. 2



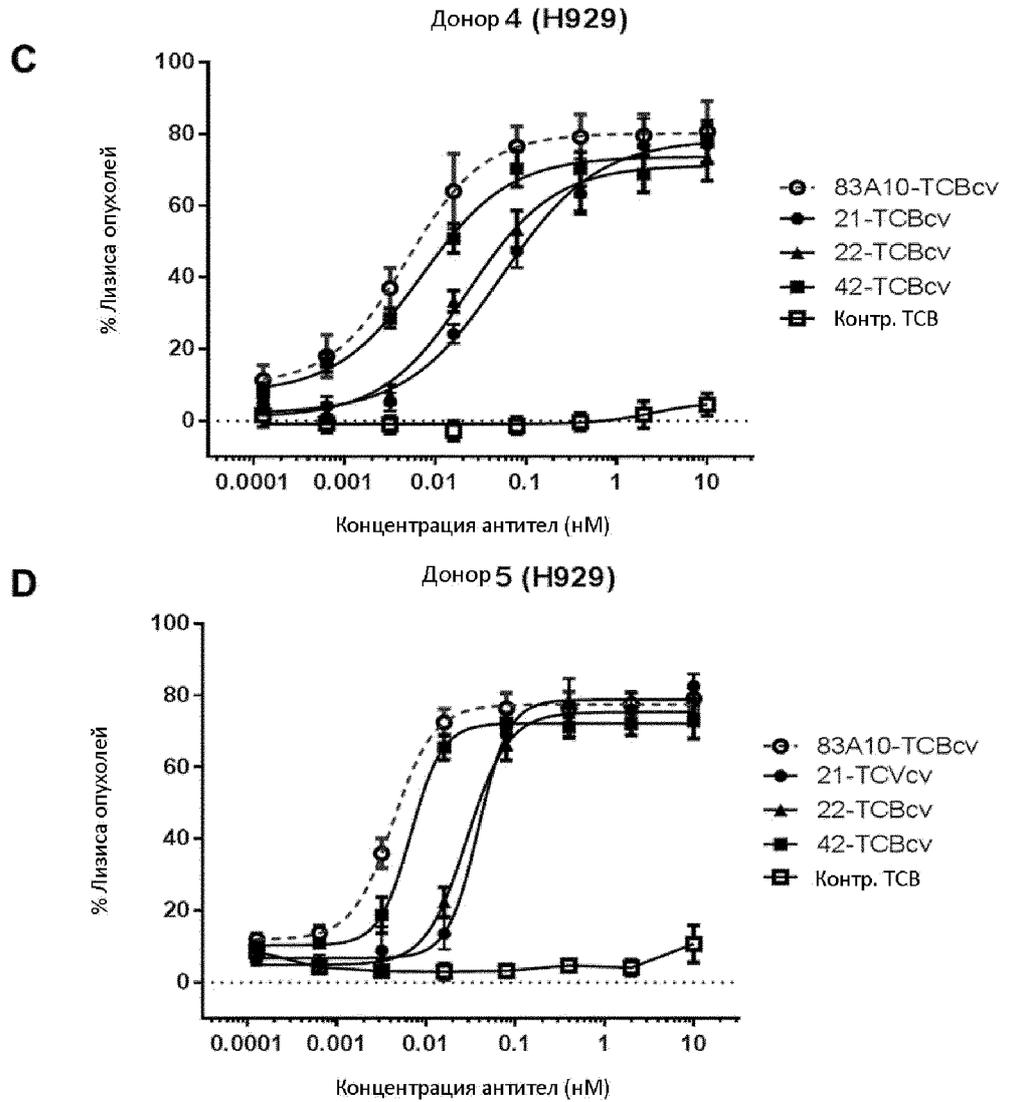
Фиг. 3



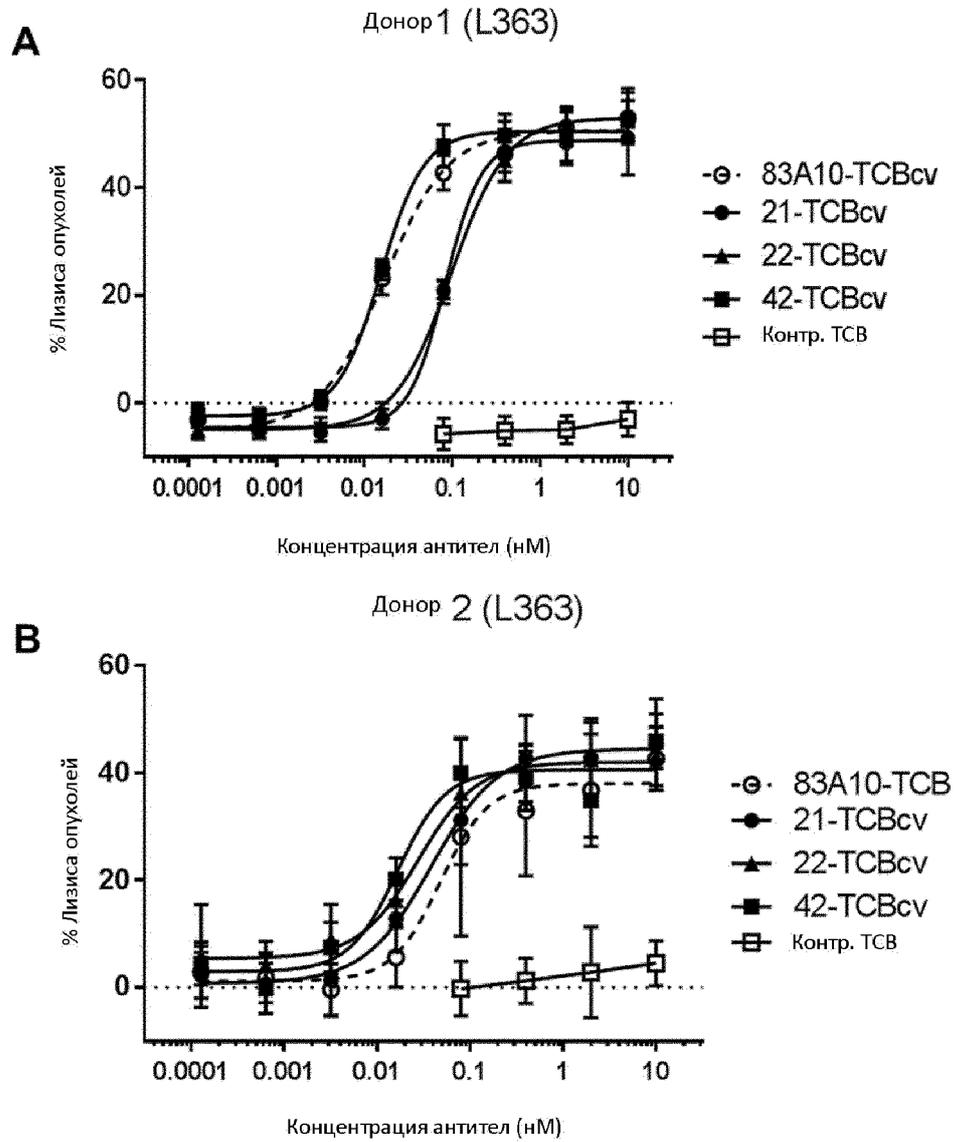
Фиг. 4



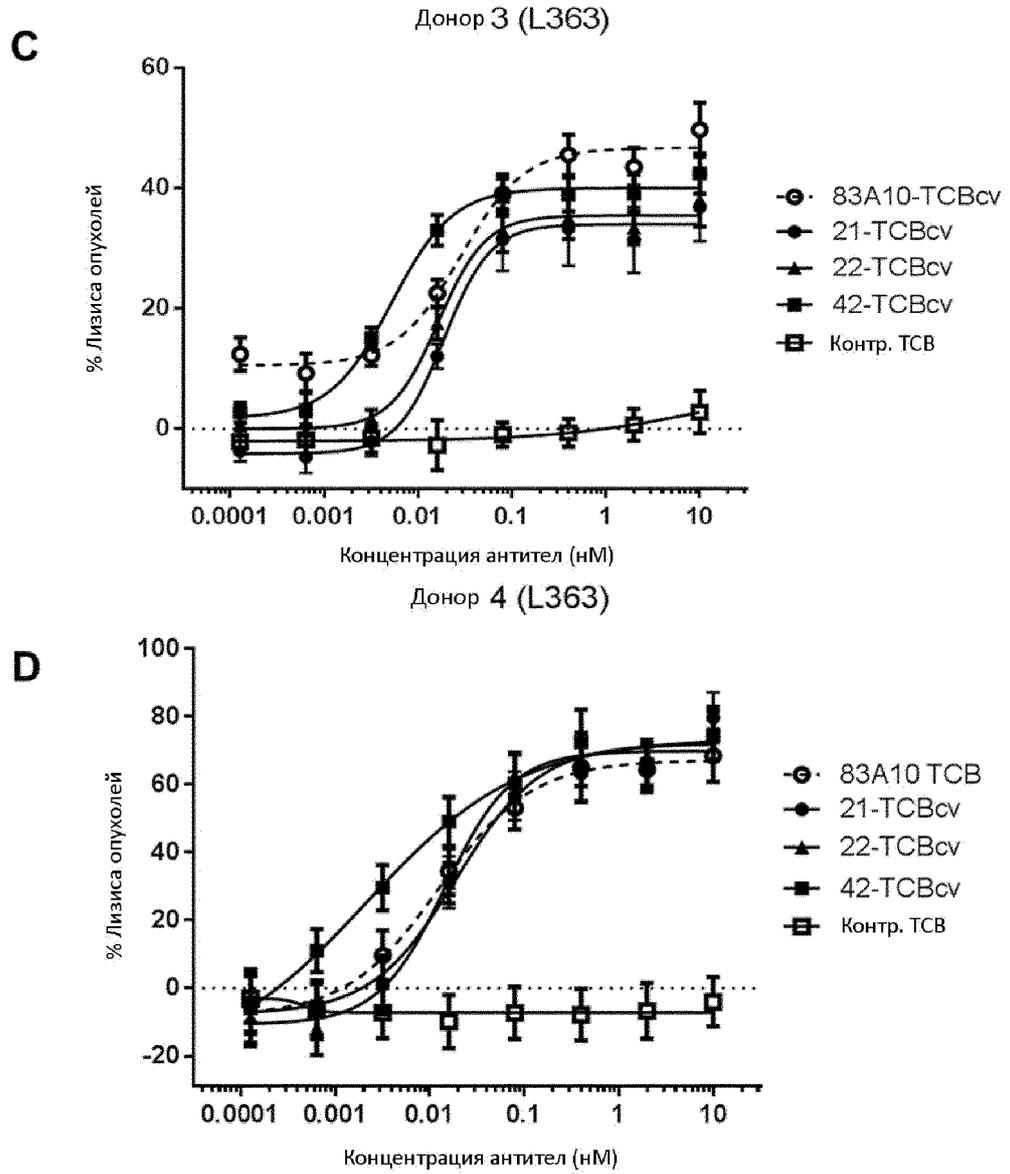
Фиг. 4 (Продолжение)



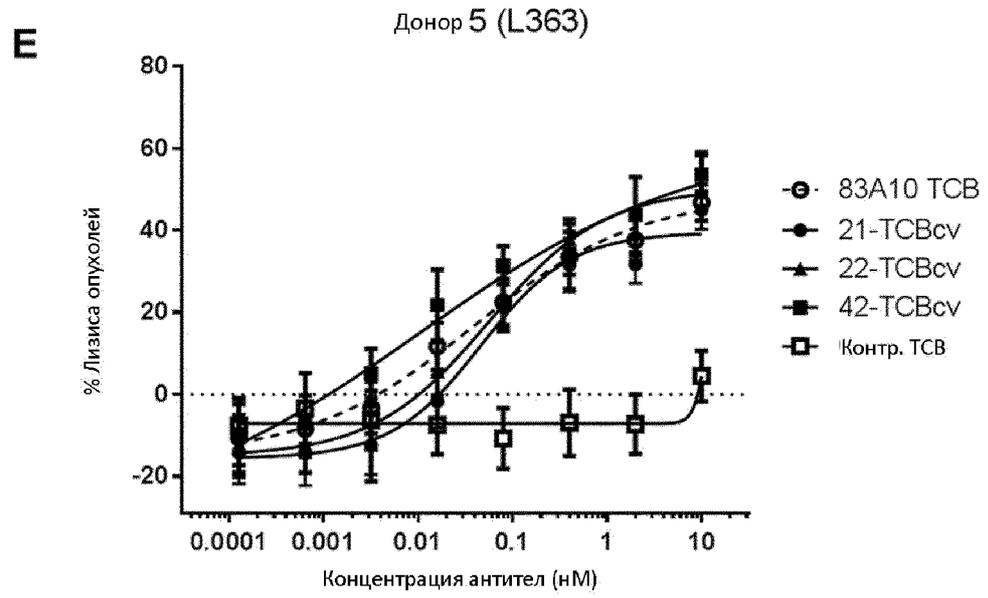
Фиг. 5



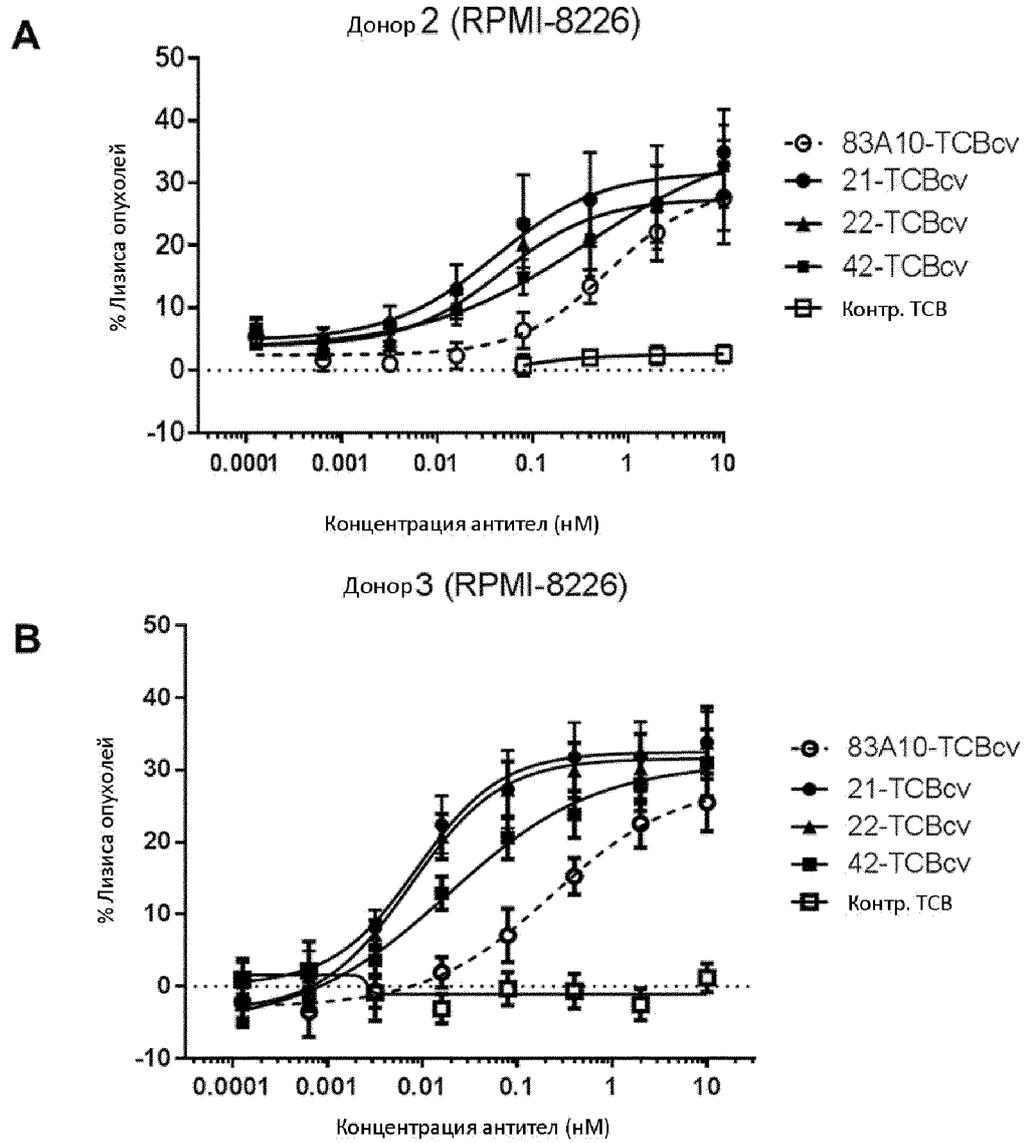
Фиг. 5 (Продолжение)



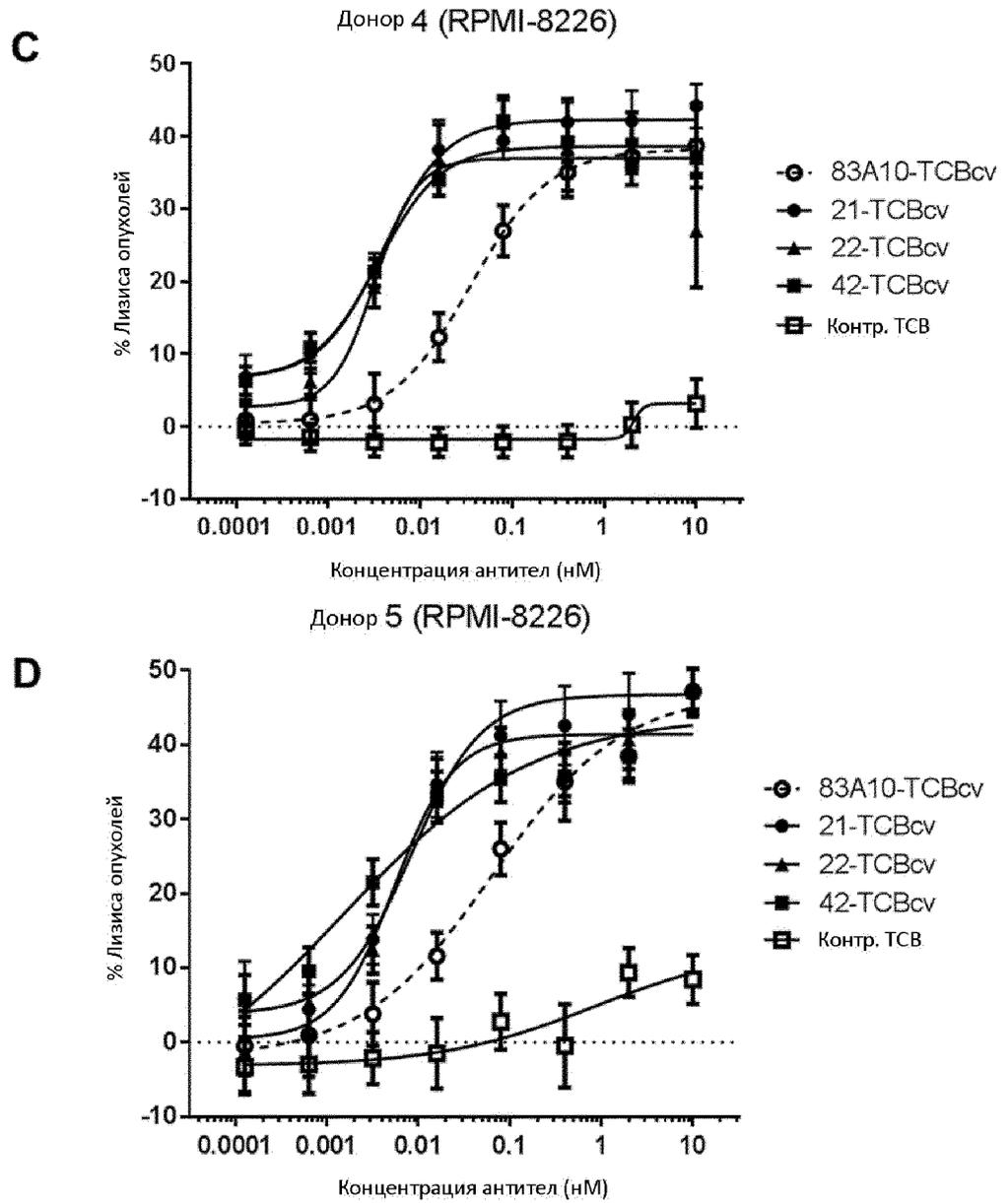
Фиг. 5 (Продолжение)



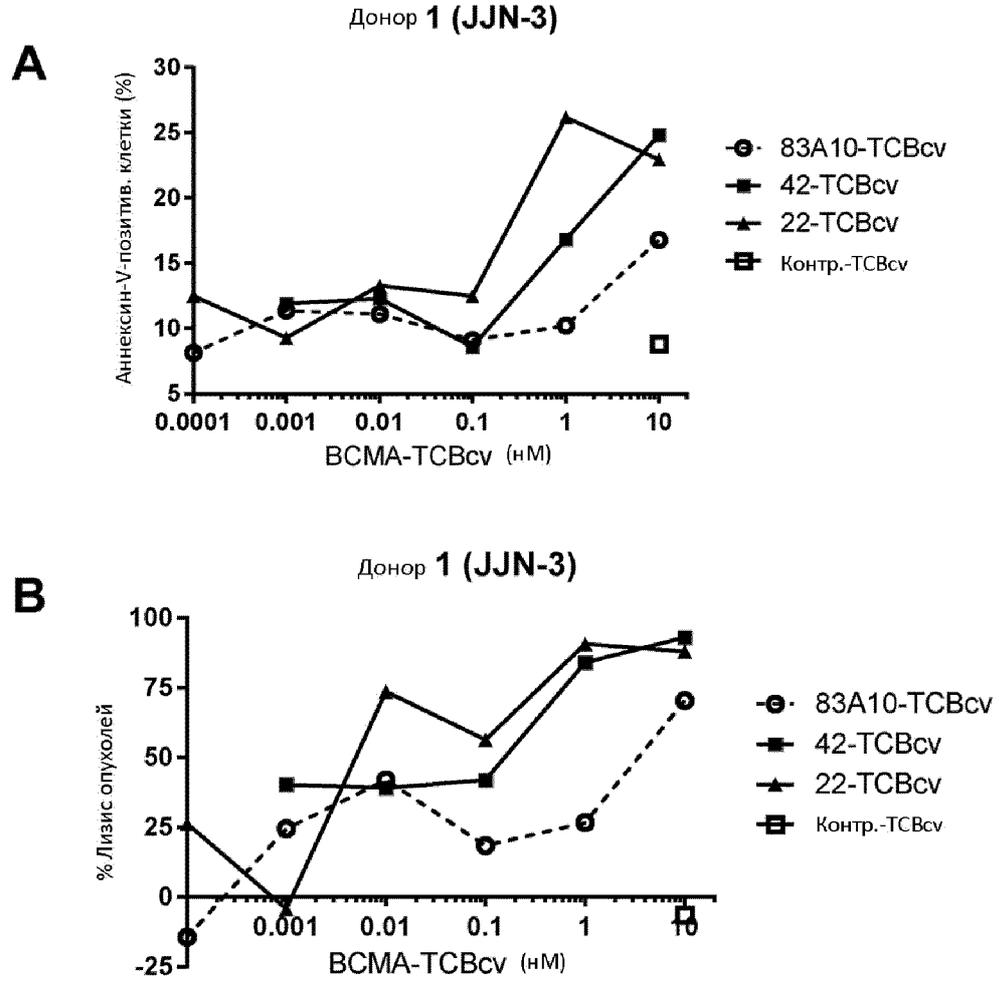
Фиг. 6



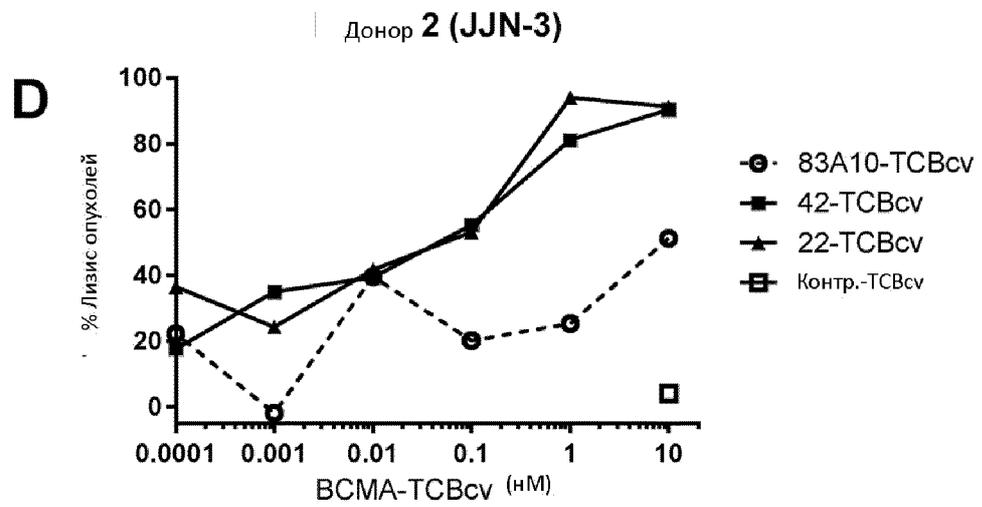
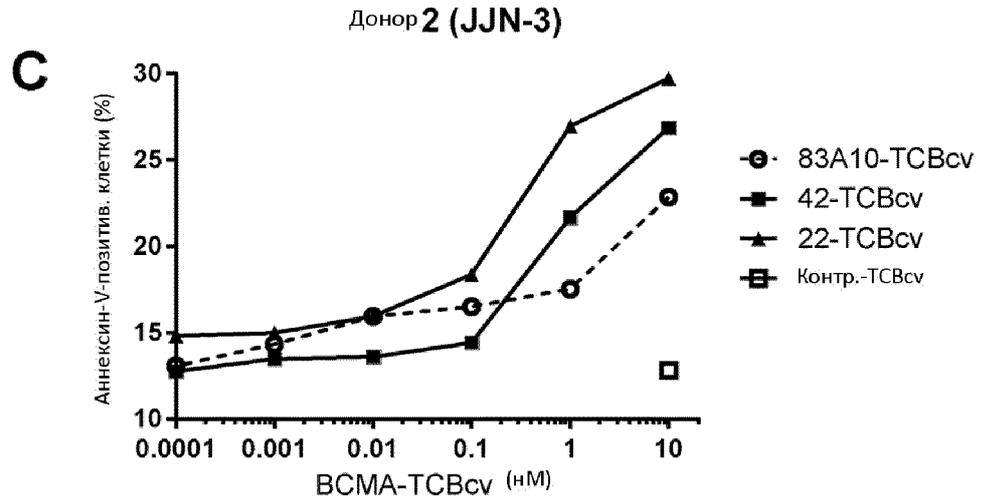
Фиг. 6 (Продолжение)



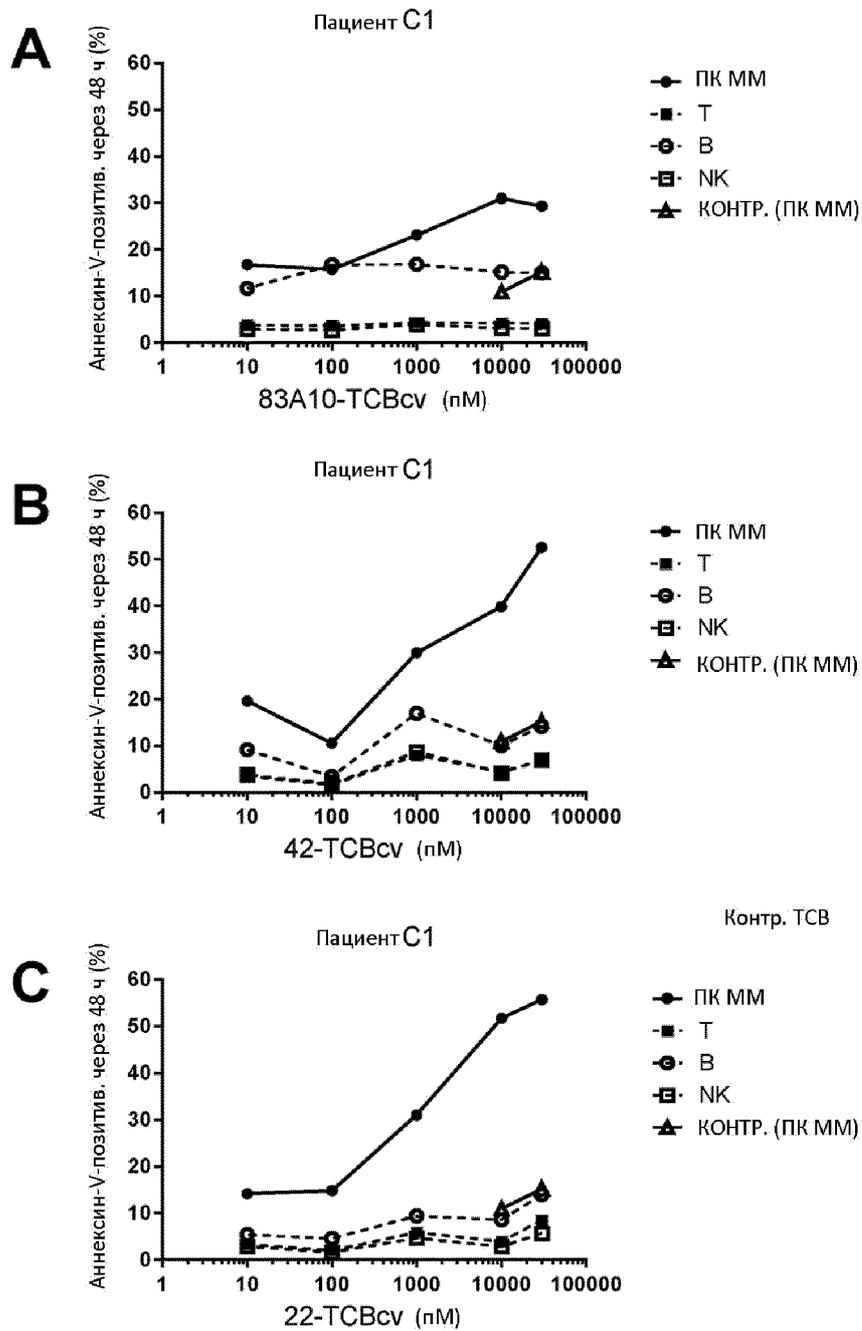
Фиг. 7



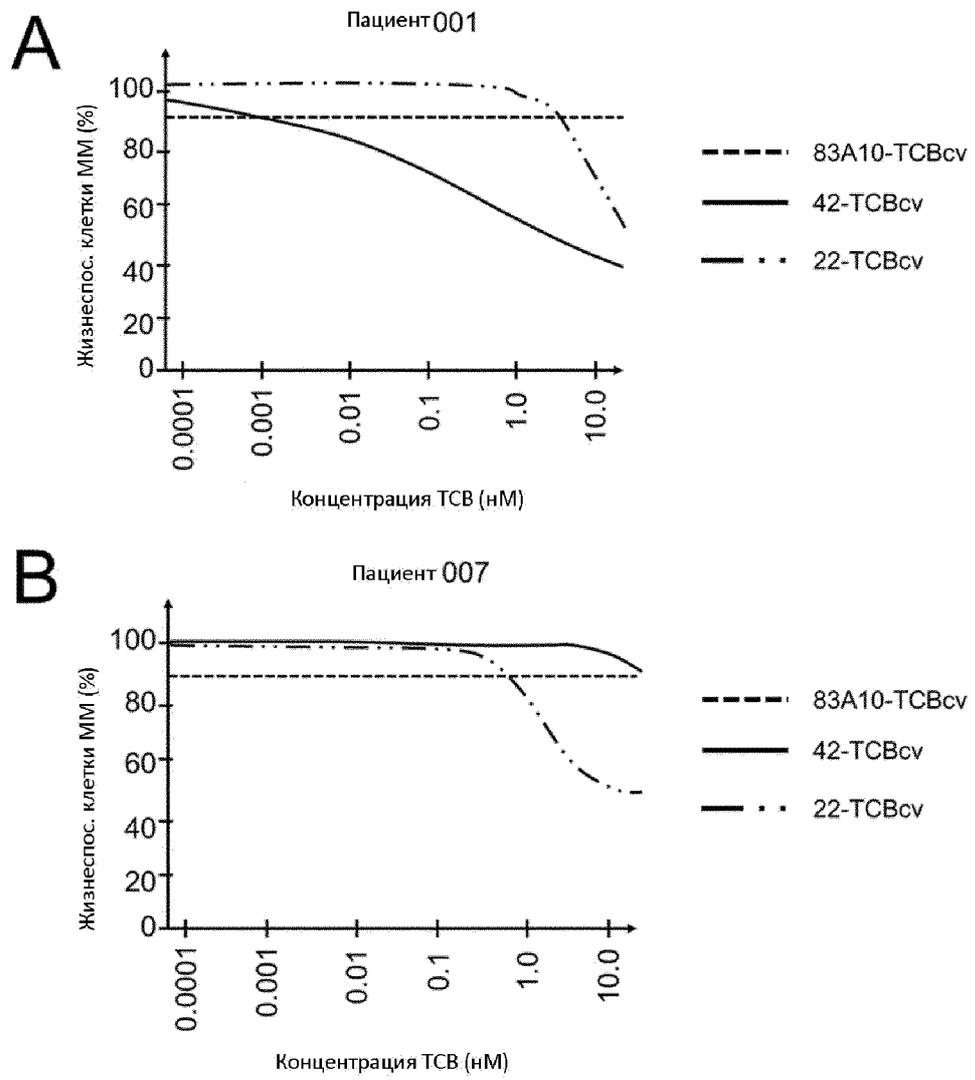
Фиг. 7 (Продолжение)



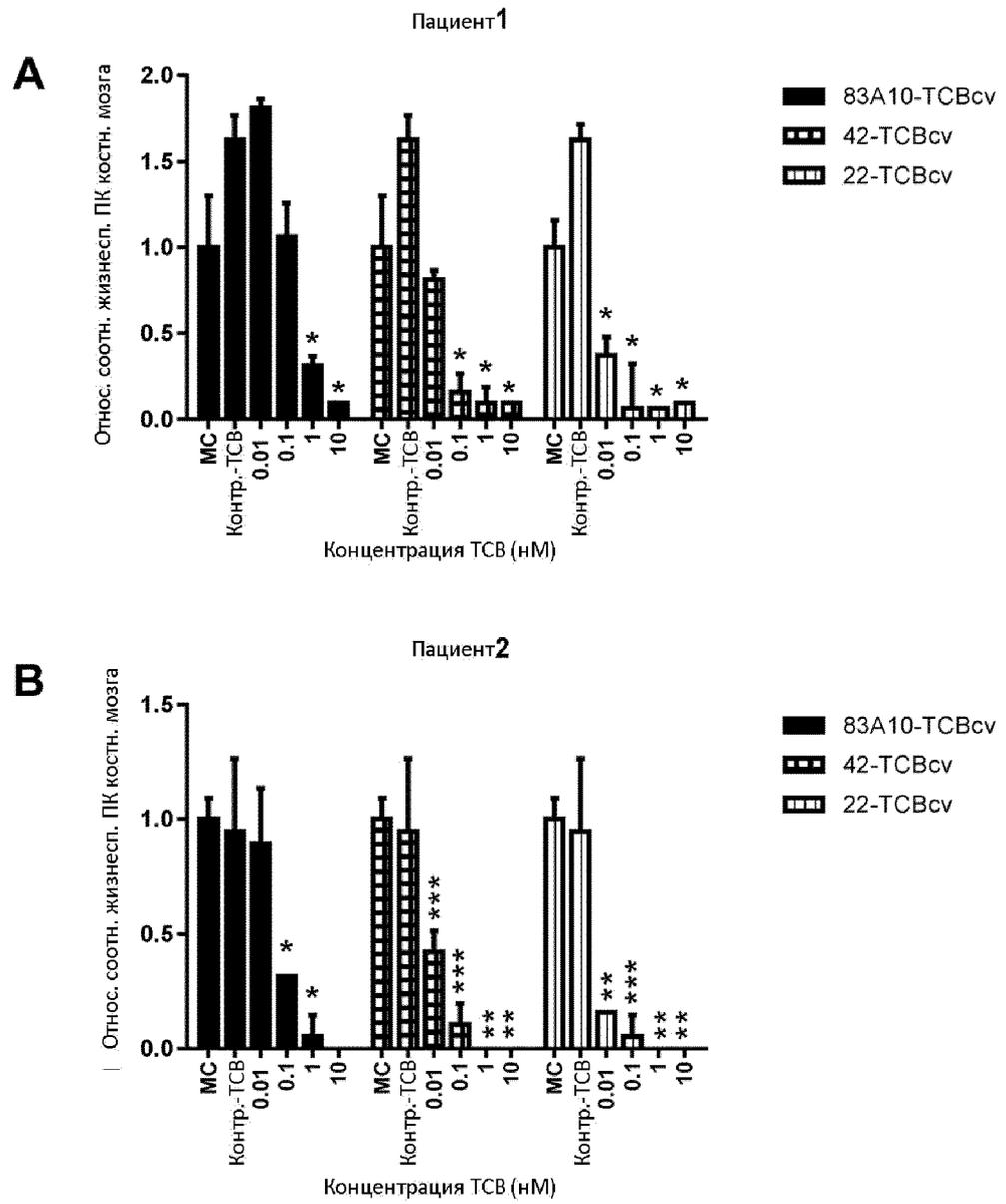
Фиг. 8



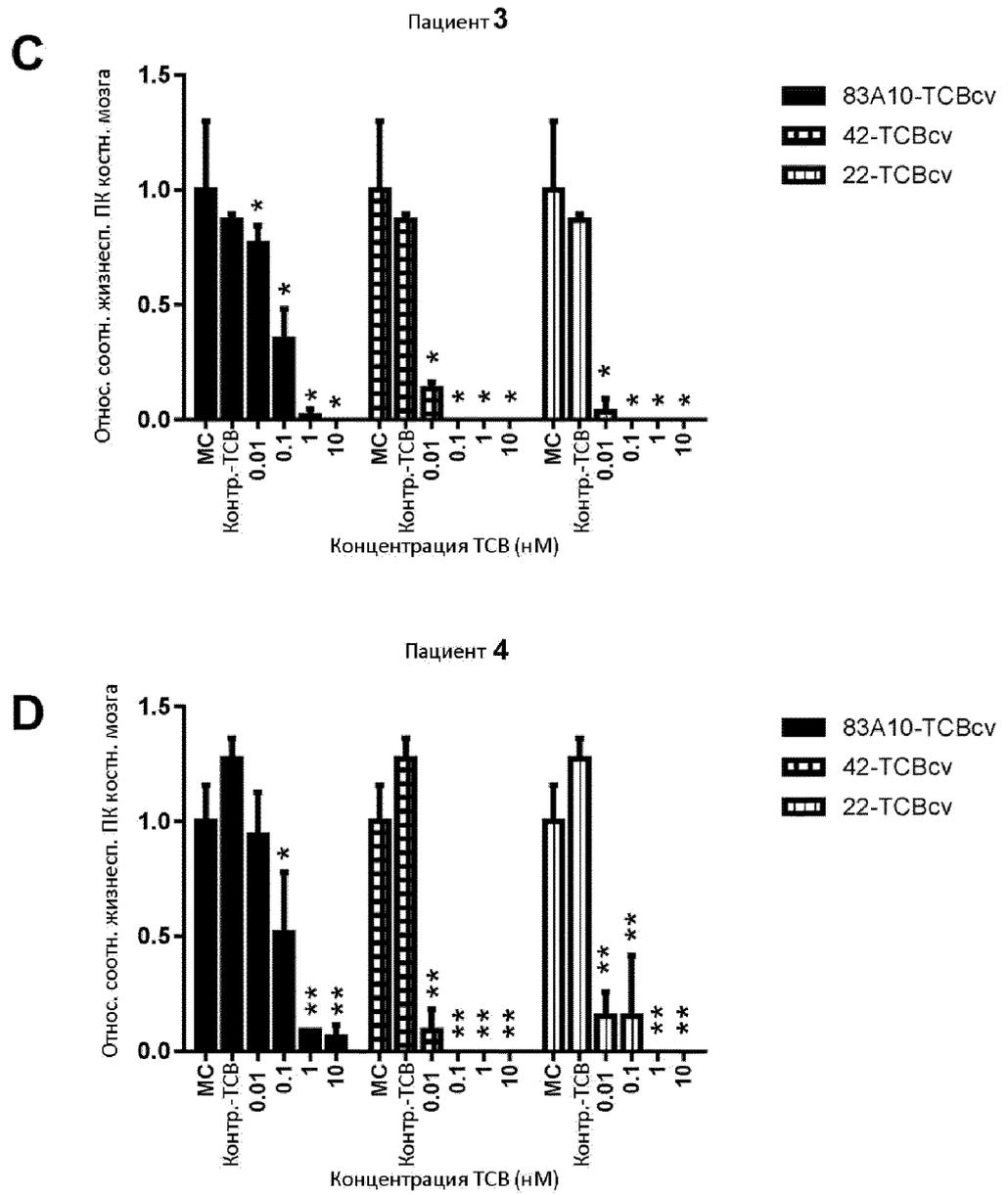
Фиг. 9



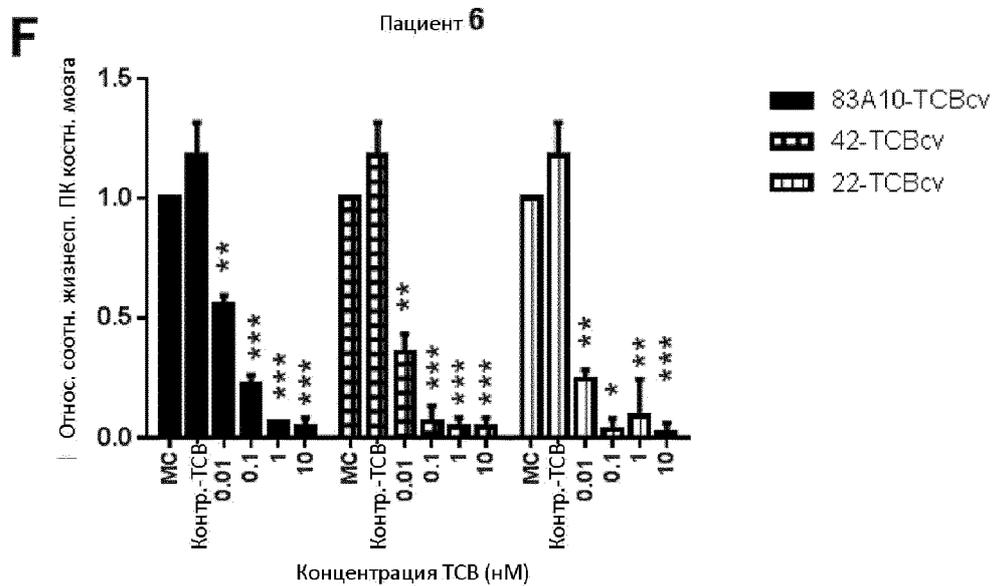
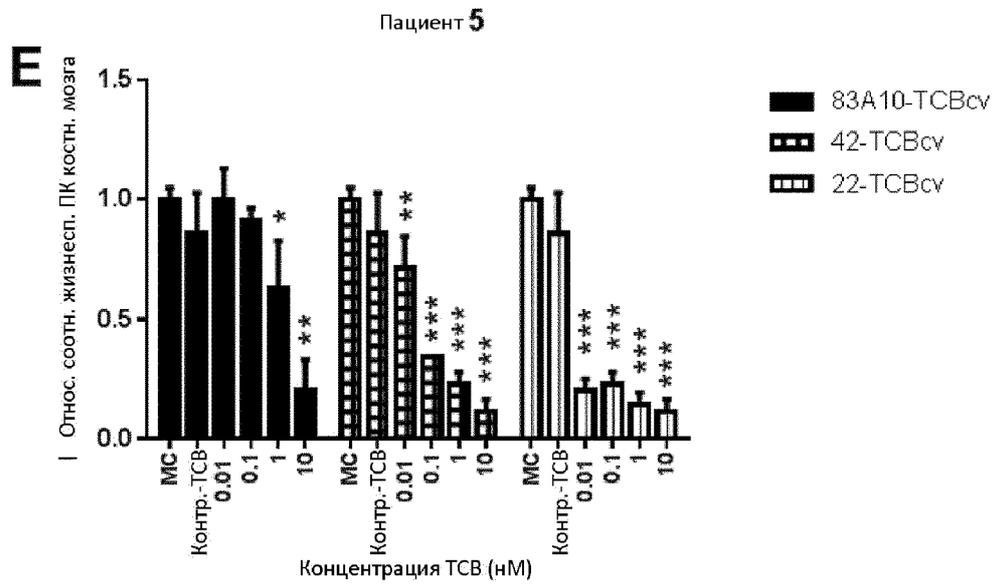
Фиг. 10



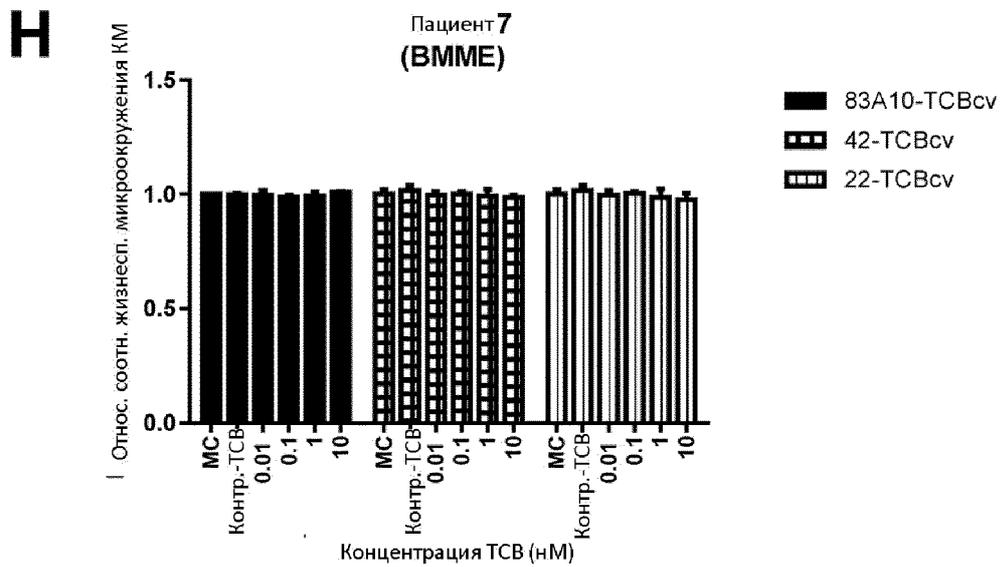
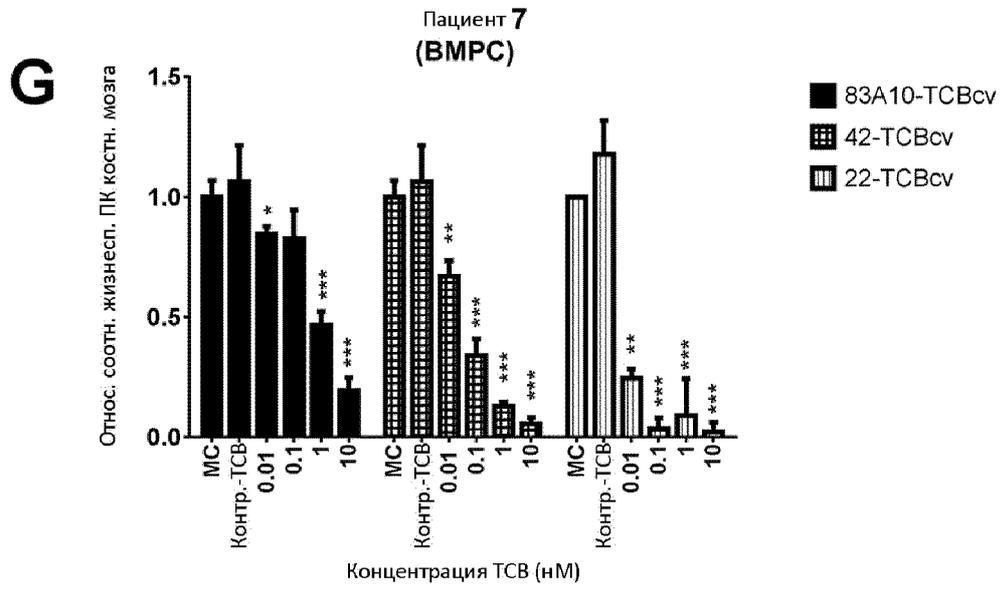
Фиг. 10 (Продолжение)



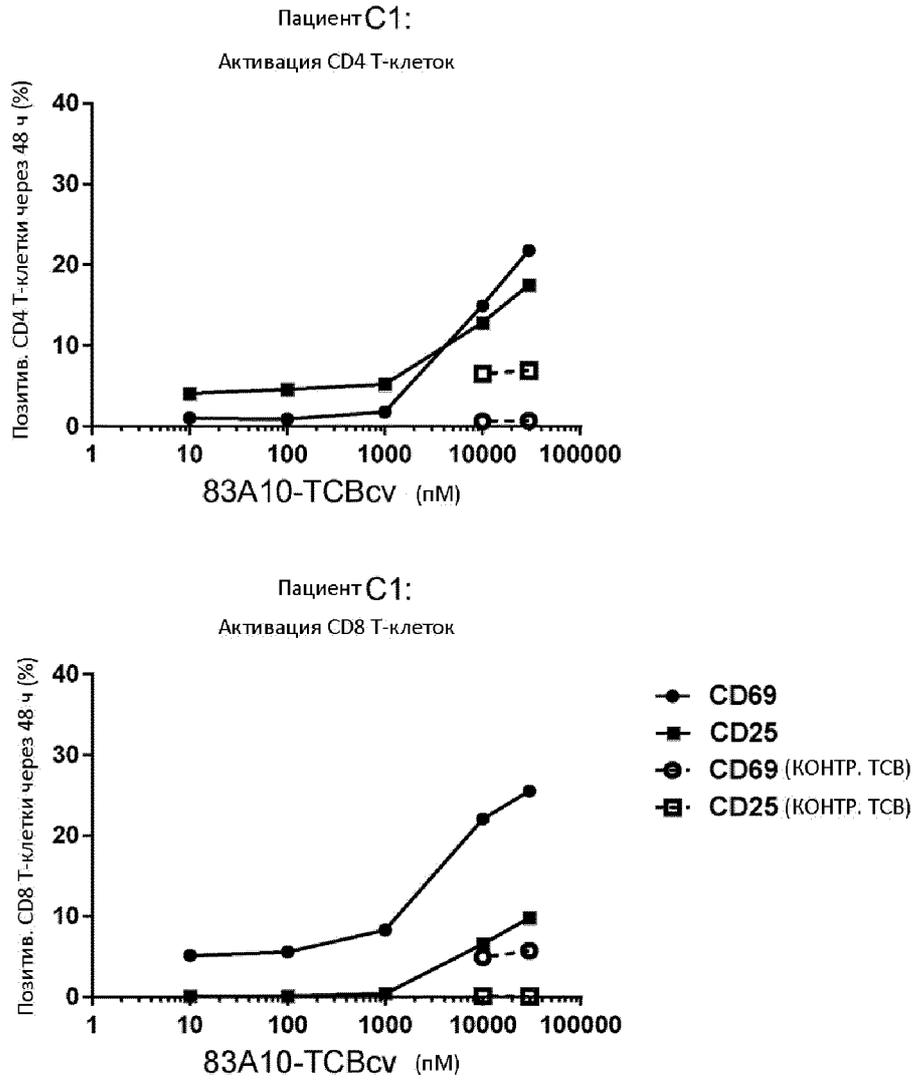
Фиг. 10 (Продолжение)



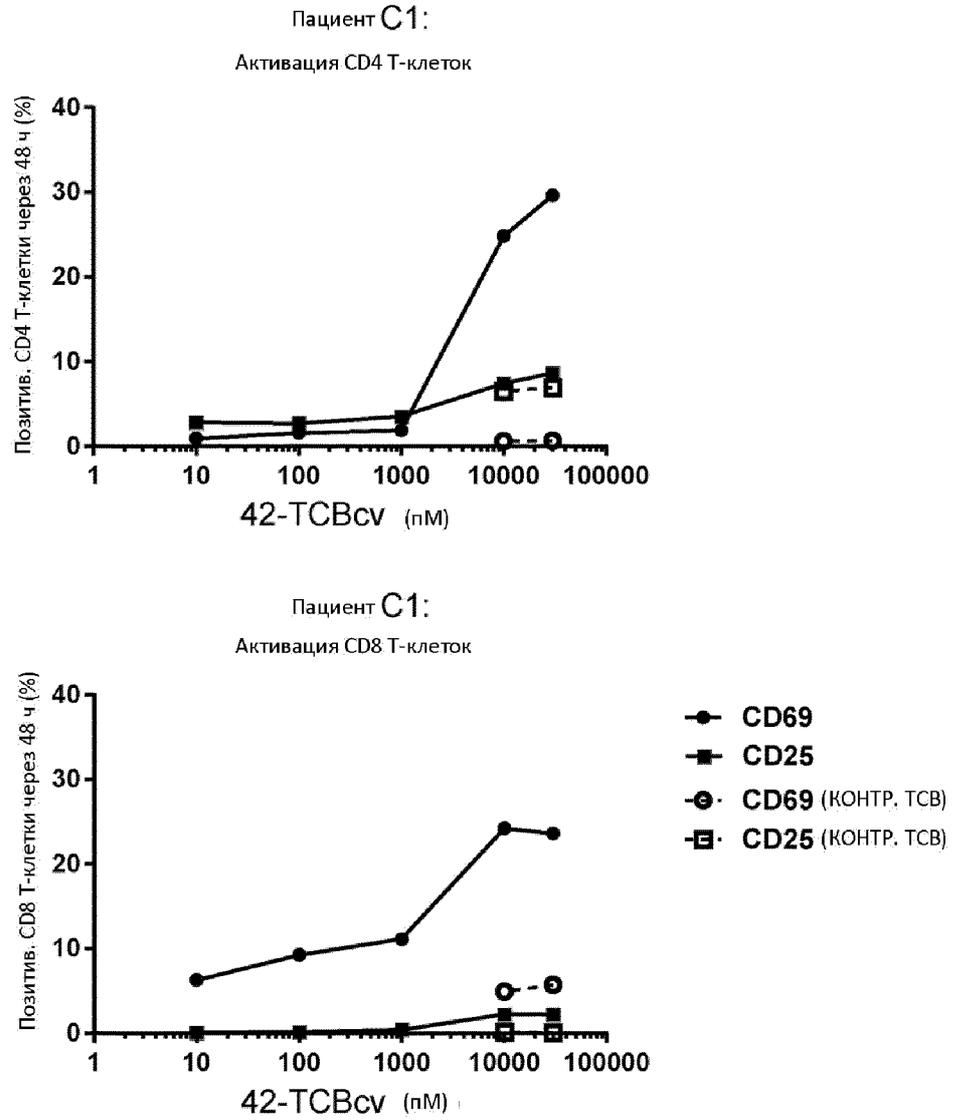
Фиг. 10 (Продолжение)



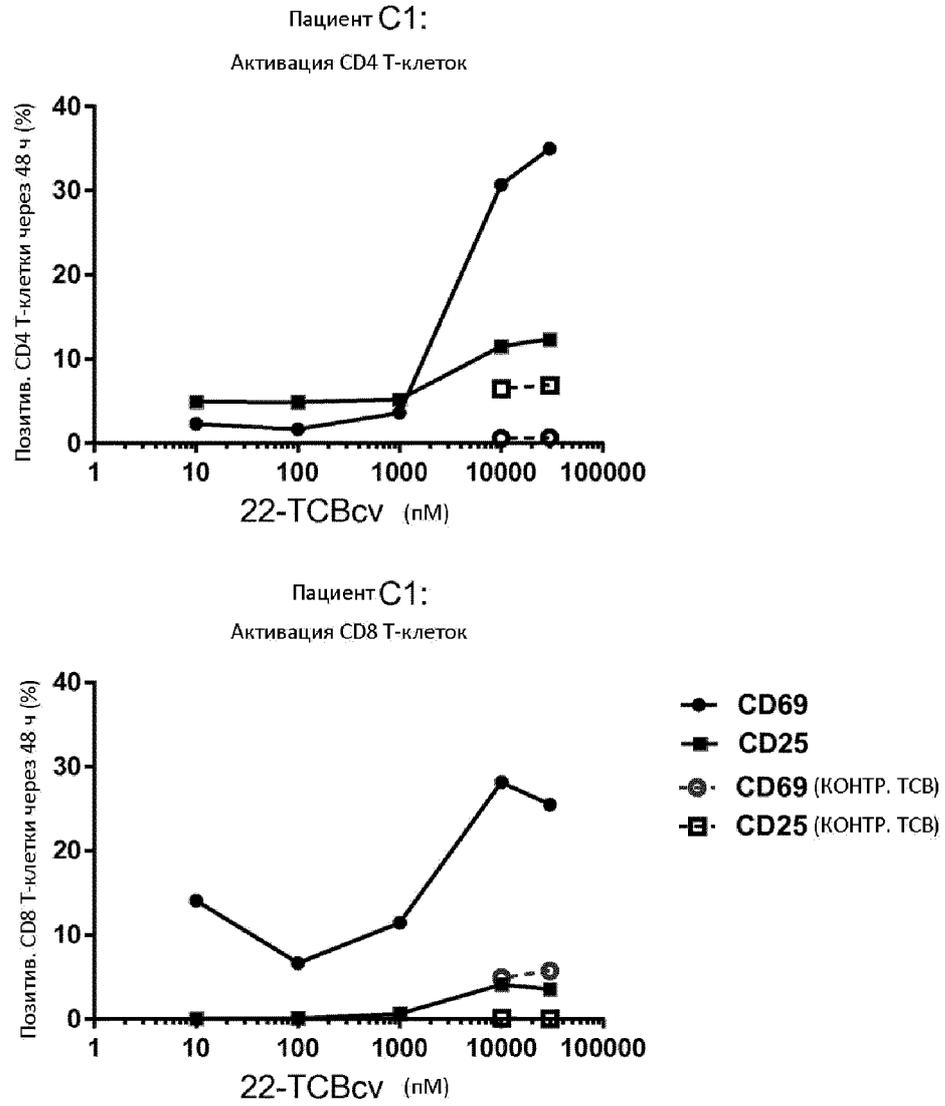
Фиг. 11А

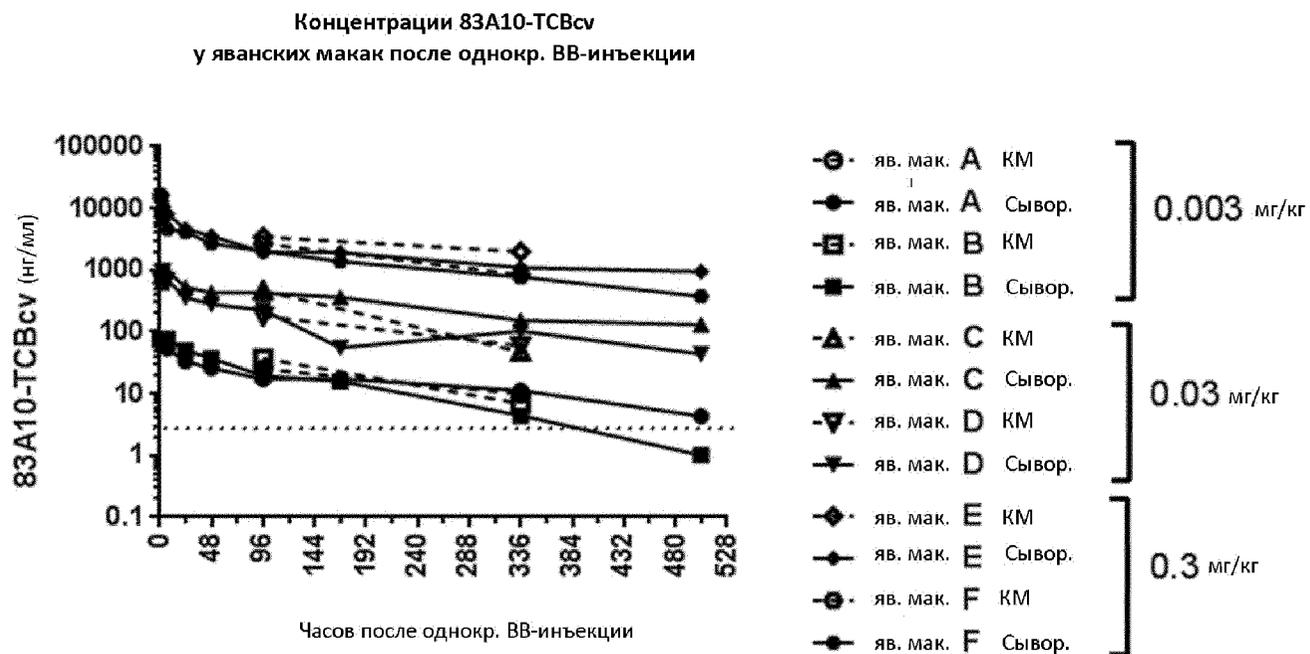


Фиг. 11В

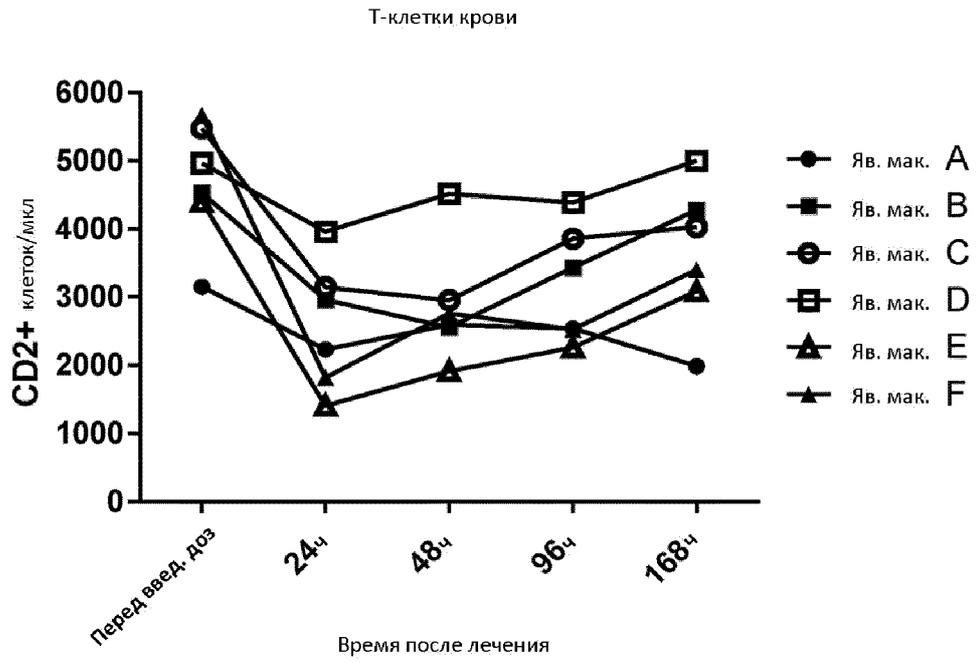


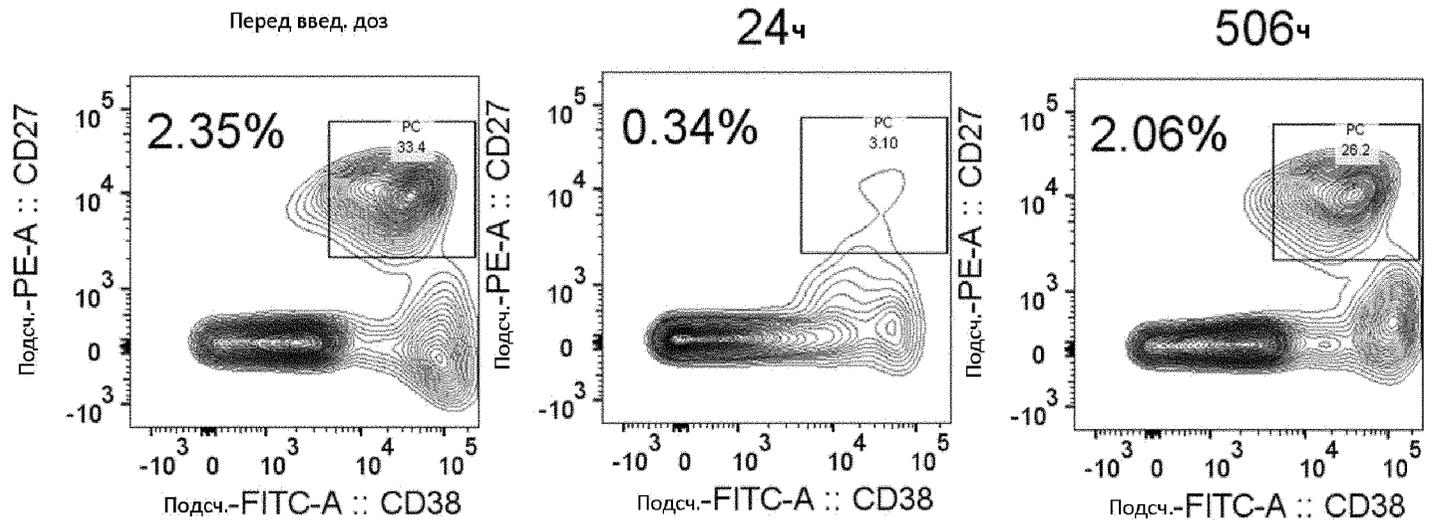
Фиг. 11С





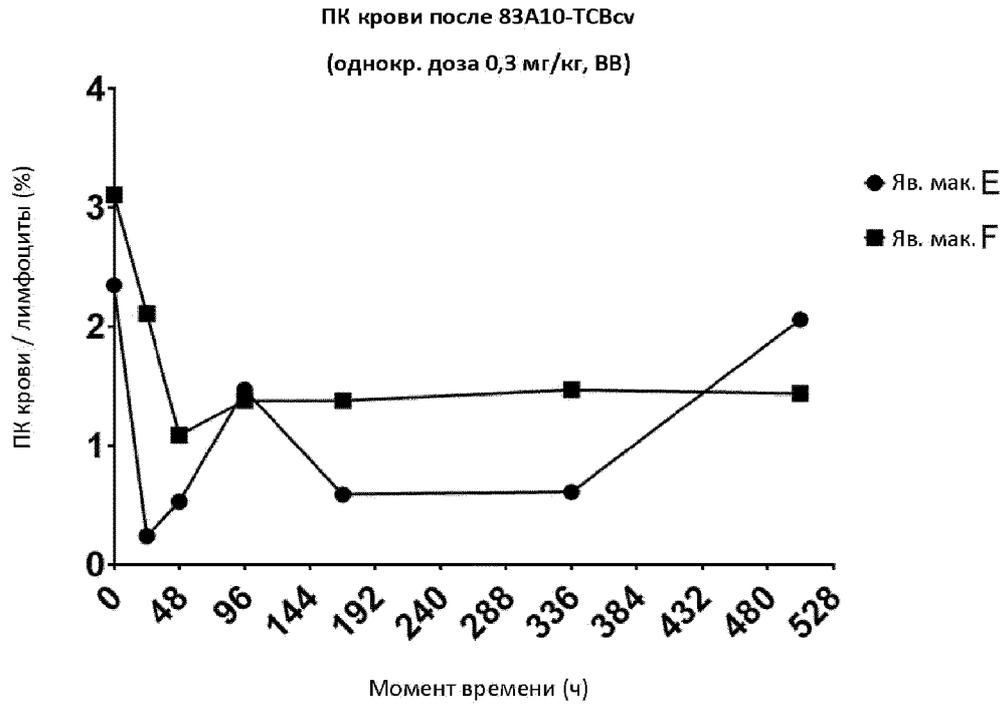
Фиг. 13



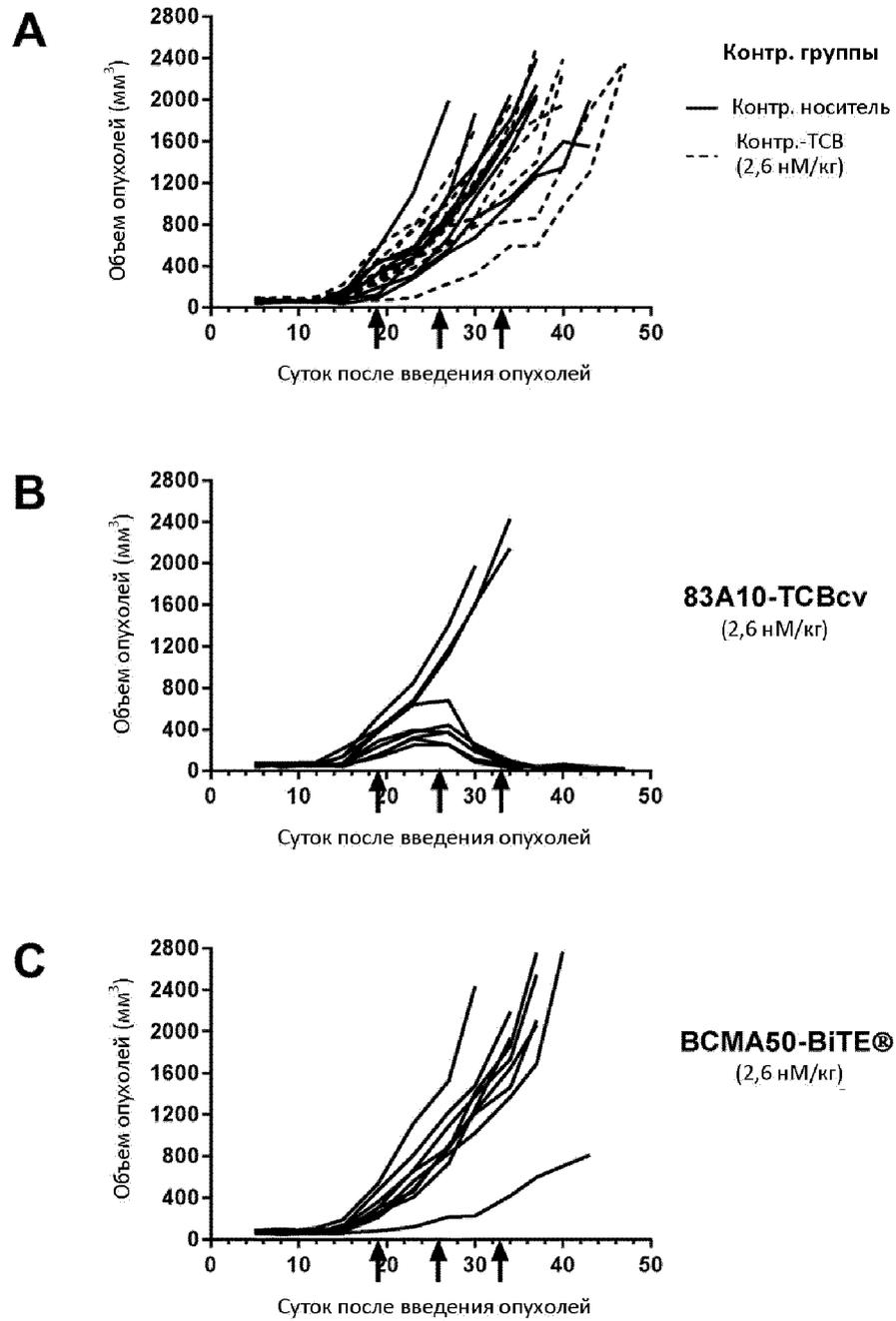


Фиг. 14А

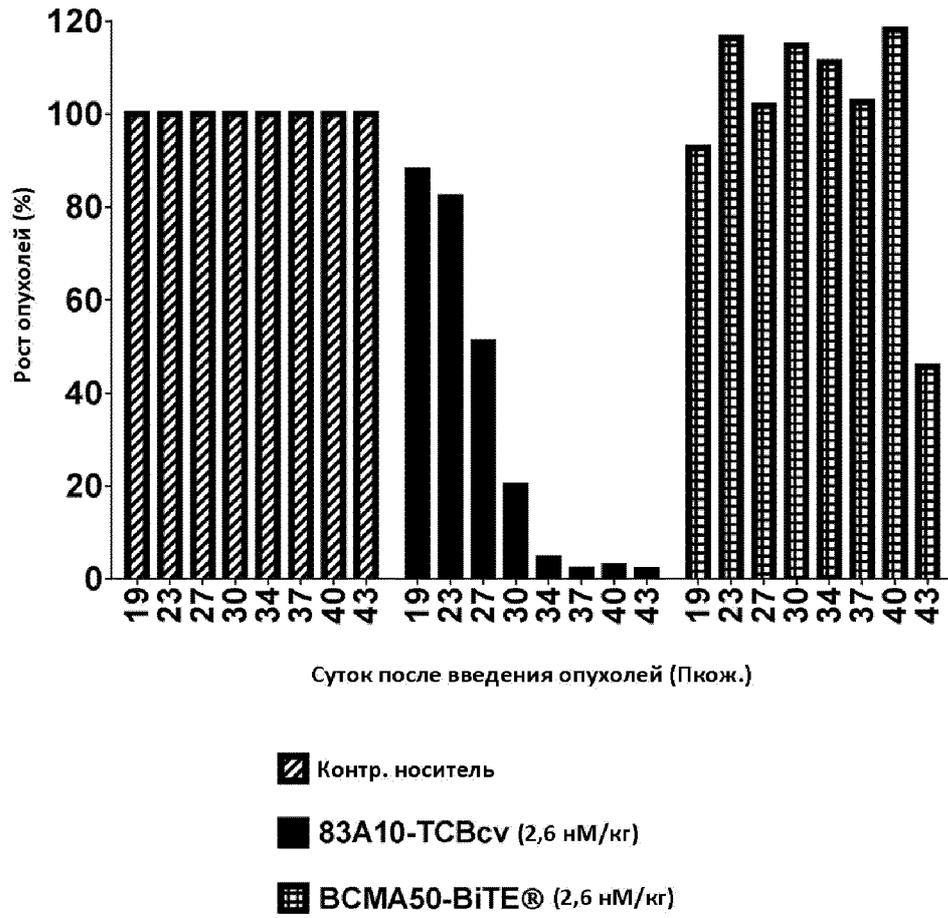
Фиг. 14В

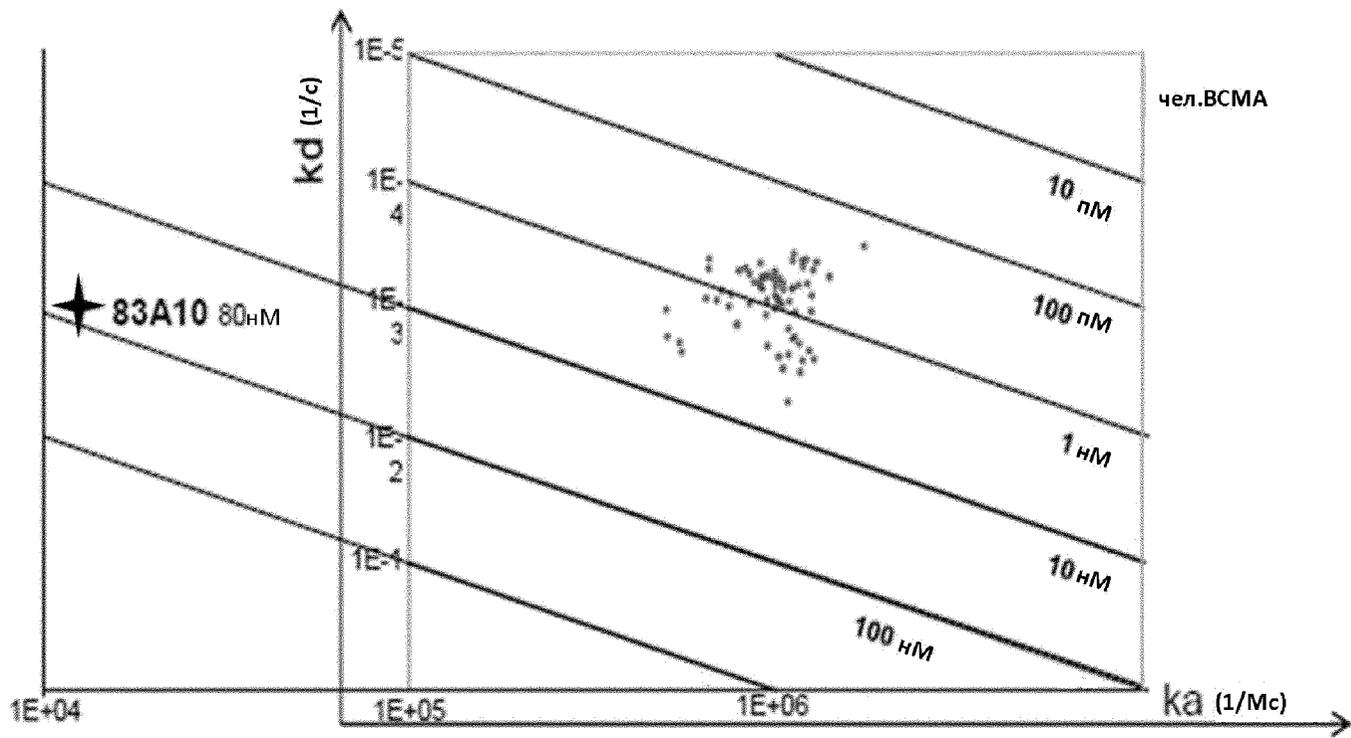


Фиг. 15

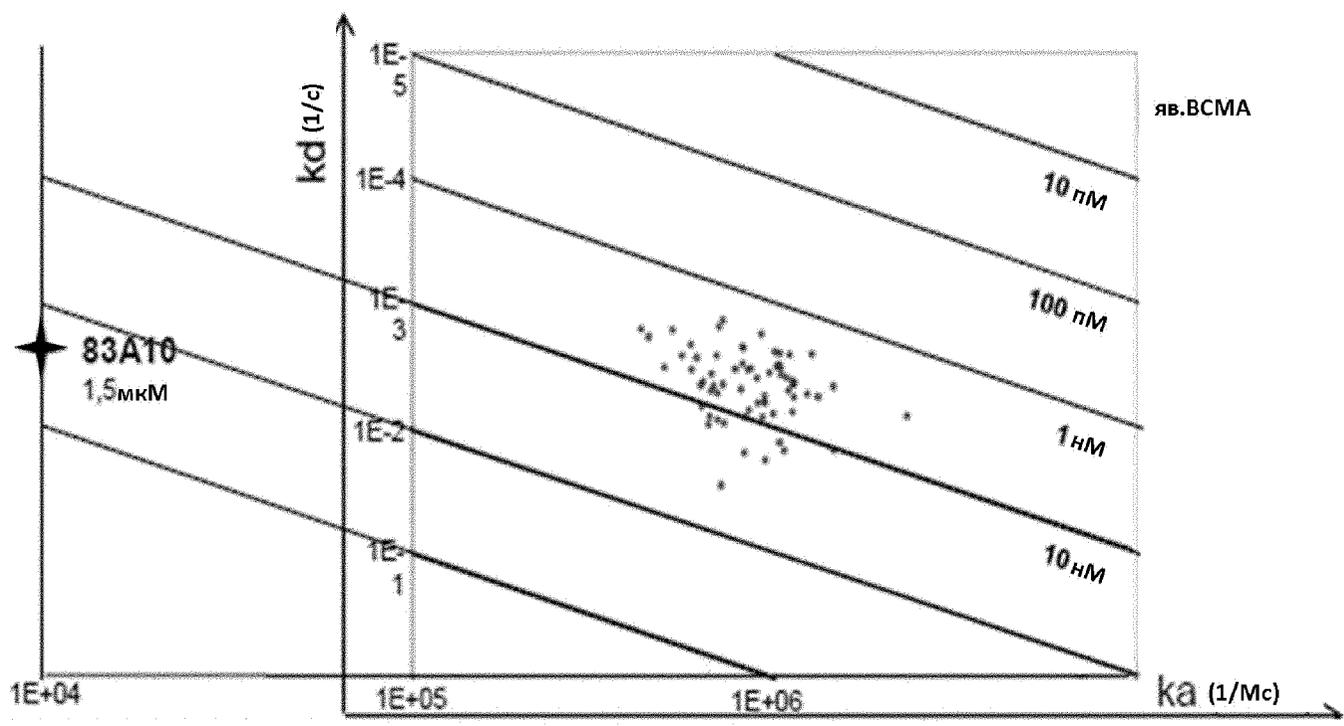


Фиг. 16





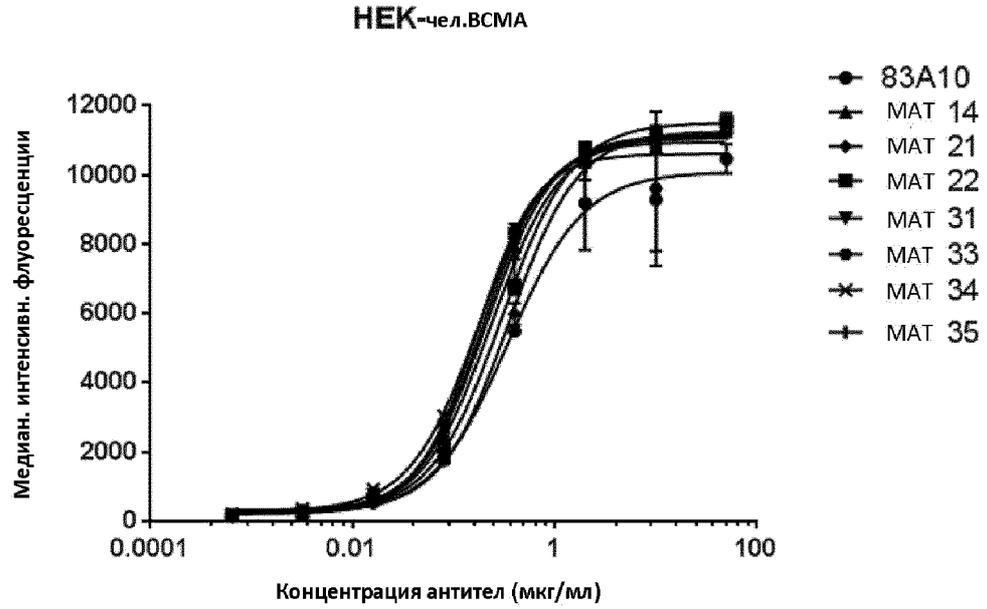
Фиг. 17
А



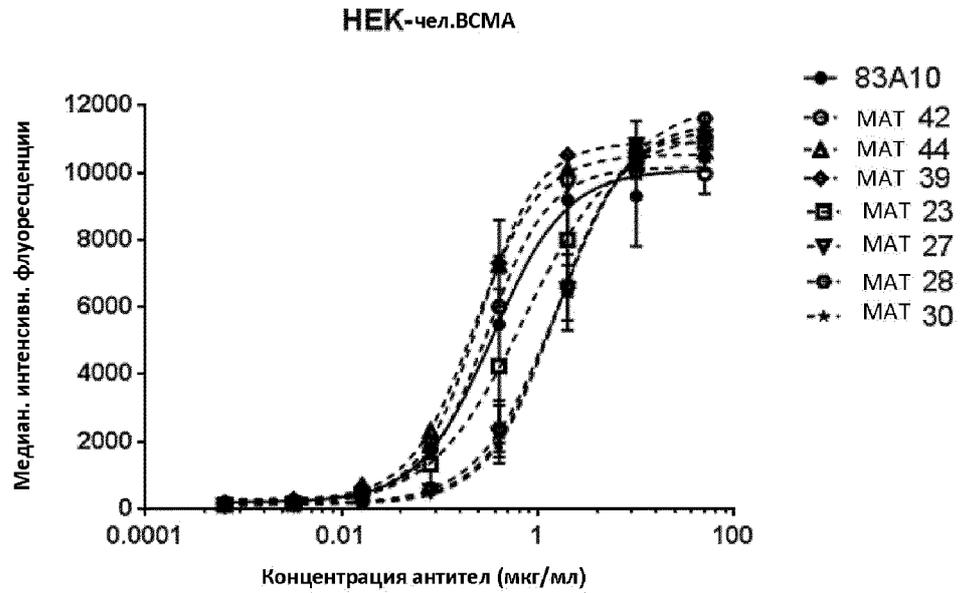
Фиг. 17
В

Фиг. 18

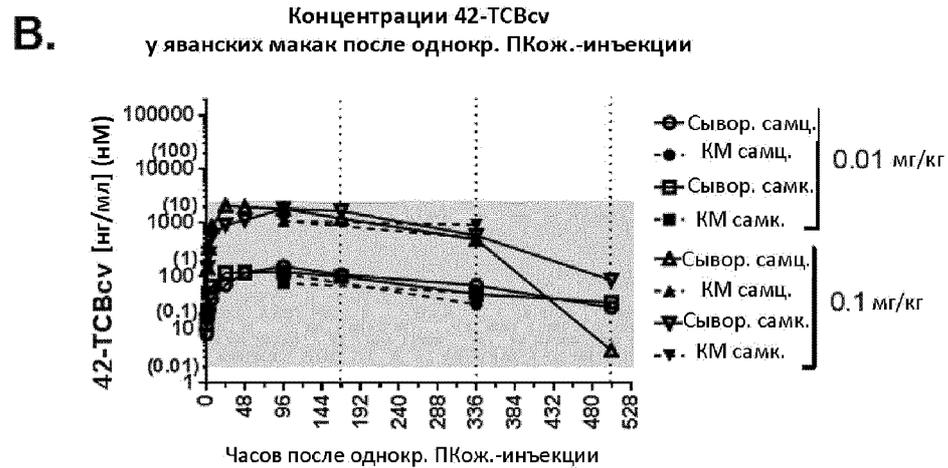
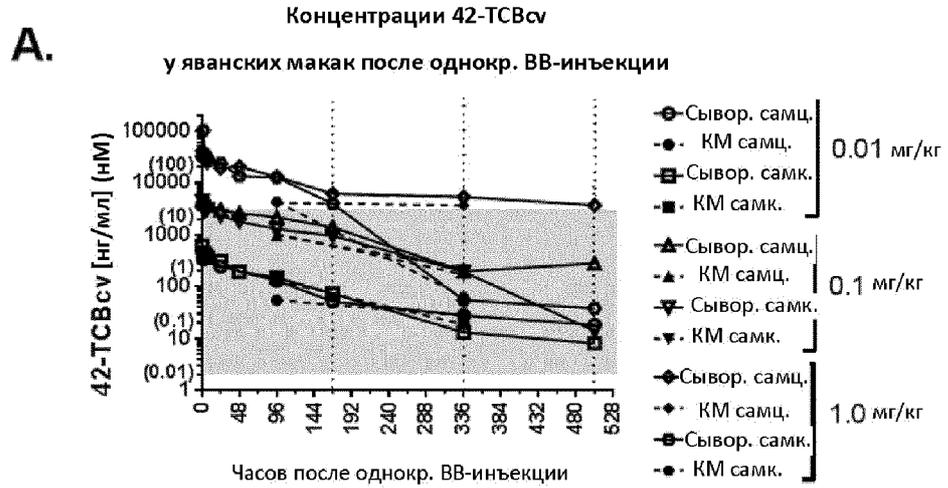
А



В



Фиг. 19



Фиг. 20

