

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190089** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.03.22

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.21

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

---

(54) **БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-PSMA X АНТИ-CD28 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/688,227; 62/781,980; 62/781,930;  
62/815,878

(32) 2018.06.21; 2018.12.19; 2018.12.19;  
2019.03.08

(33) US

(86) PCT/US2019/038460

(87) WO 2019/246514 2019.12.26

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Мерфи Эндрю Дж., Скокос Димитрис,  
Уэйт Джейнелл, Уллман Эрика,  
Херманн Айнур, Смит Эрик, Абер  
Лорик, Янкопулос Джордж Д. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает PSMA человека. В отдельных вариантах осуществления биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих PSMA, таких как опухоли предстательной железы. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению эффективны для лечения заболеваний и расстройств, при которых желателен и/или терапевтически эффективен повышенный или индуцированный нацеленный иммунный ответ.

**A1**

**202190089**

**202190089**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566379EA/050

### БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-PSMA X АНТИ-CD28 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка связана с предварительной заявкой на патент США № 62/688227, поданной 21 июня 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/781930, поданной 19 декабря 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/781980, поданной 19 декабря 2018 г., и предварительной заявкой на патент США № 62/815878, поданной 8 марта 2019 г, и испрашивает приоритет на их основании. Полное содержание вышеупомянутых заявок в явном виде включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 20 июня 2019 г., названа 10367WO01\_118003-45220\_SL.TXT и имеет размер 48 690 байт.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD28 и молекулу-мишень, такую как PSMA, и способам их применения.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] CD28 представляет собой трансмембранный белок I типа, экспрессируемый на поверхности Т-клеток, который имеет единственный внеклеточный Ig-подобный домен V-типа, собранный в виде гомодимера. CD28 является рецептором для белков CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) и активируется CD80 или CD86, экспрессируемыми на АПК. Связывание CD28 с CD80 или CD86 обеспечивает костимулирующие сигналы, важные для активации и выживания Т-клеток. Стимуляция Т-клеток посредством CD28 в дополнение к Т-клеточному рецептору (TCR) обеспечивает мощный сигнал для продукции различных интерлейкинов. CD28 усиливает клеточные сигналы, такие как сигнальные пути, контролируемые фактором транскрипции NFκB, после активации TCR. Сопутствующий сигнал CD28 важен для эффективной активации Т-клеток, такой как дифференцировка, пролиферация, высвобождение цитокинов и уничтожение клеток Т-клетками.

[0005] Антитела к CD28 были предложены для применения в терапевтических целях, включая активацию Т-клеток. Одно конкретное антитело к CD28, TGN1412 (суперагонист к CD28), было использовано в клиническом исследовании. TGN1412 вызвало цитокиновый шторм, который не был предсказан токсикологическими исследованиями или исследованиями ex vivo с МНПК человека. В 2006 году шести здоровым добровольцам внутривенно ввели TGN1412 (суперагонист к CD28) в дозе 0,1 мг/кг. В течение 2 часов у всех шести пациентов наблюдались выраженные воспалительные реакции (цитокиновый

шторм). В течение 16 часов у всех пациентов наблюдалась полиорганная недостаточность. Субъектам вводили кортикостероиды, и уровни цитокинов вернулись к нормальным уровням по прошествии 2-3 дней. Начальная доза 0,1 мг/кг в исследовании фазы 1 (связанном с CRS (синдром высвобождения цитокинов)) была основана на 500-кратно большем уровне, при котором не наблюдается неблагоприятного воздействия «NOAEL», составившем 50 мг/кг у яванских макаков (Suntharalingam, *et al.*, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, NEJM 355:1018-1028 (2006)).

[0006] Токсикологическое исследование на яванских макаках не позволило спрогнозировать цитокиновый ответ, который наблюдали у людей.

[0007] PSMA (простатоспецифичный мембранный антиген)/FOLH1 является «хорошо охарактеризованной» опухолевой мишенью. PSMA представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа, сверхэкспрессируемый при раке предстательной железы. Он также известен как глутаматкарбоксипептидаза II (GPC). В нормальной предстательной железе человека PSMA связан с цитоплазмой и апикальной стороной эпителия, окружающего протоки предстательной железы. Диспластическая и/или неопластическая трансформация ткани предстательной железы приводит к переносу PSMA с апикальной мембраны на просветную поверхность протоков. PSMA подвергается конститутивному эндоцитозу и не слущивается. PSMA является мишенью в различных клинических исследованиях ADC (конъюгата антитело-лекарственное средство) и методах визуализации. PSMA в высокой степени экспрессируется в аденокарциноме предстательной железы человека и соответствует метастазам (лимфатические узлы). В опухолях предстательной железы уровни экспрессии PSMA увеличиваются в зависимости от стадии и степени. Переход в андроген-независимую форму рака предстательной железы в конечном итоге приводит к увеличению экспрессии. Интересно, что экспрессия PSMA также была обнаружена в новообразованных сосудах некоторых солидных опухолей (включая рак ободочной кишки, легкого, молочной железы, почки и подтипы рака мочевого пузыря).

[0008] PSMA также экспрессируется в здоровых тканях. Самая сильная экспрессия встречается в эпителиальных клетках предстательной железы, двенадцатиперстной кишке, клетках почечных канальцев, слюнных железах и астроцитах. PSMA в низкой степени экспрессируется в фаллопиевых трубах, молочной железе и редко экспрессируется в эндотелии шейки матки.

[0009] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как CD28, так и антиген-мишень (такой как PSMA), были бы эффективны в терапевтических ситуациях, где требуется специфичное нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих указанный антиген-мишень. Также существует потребность в антителе к CD28, безопасном для применения в составе фармацевтической композиции.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В первом аспекте настоящего изобретения предложены биспецифичные

антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD28 и антиген-мишень. Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления биспецифичные антигенсвязывающие молекулы связывают CD28 и PSMA; такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также называются в настоящем документе «биспецифичными молекулами анти-CD28/анти-PSMA». Анти-PSMA часть биспецифичной молекулы анти-CD28/анти-PSMA эффективна для нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие PSMA (например, опухолевые клетки предстательной железы), а анти-CD28 часть биспецифичной молекулы эффективна для активации Т-клеток. Одновременное связывание PSMA на опухолевой клетке и CD28 на Т-клетке способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой. Следовательно, биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению эффективны, среди прочего, для лечения заболеваний и расстройств, связанных с опухолями, экспрессирующими PSMA (например, раком предстательной железы), или вызываемых ими.

[0011] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно этому аспекту настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA. Настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-PSMA (например, биспецифичные антитела), где каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) в паре с переменной областью легкой цепи (LCVR). В отдельных иллюстративных вариантах осуществления изобретения каждый из антигенсвязывающего домена к CD28 и антигенсвязывающего домена к PSMA содержит разные, отдельные HCVR в паре с общей LCVR.

[0012] Настоящее изобретение относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в **таблице 1**. Первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, также может содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в **таблице 1**. Согласно отдельным вариантам осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленных в **таблице 1**. Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, представленных в **таблице 1**, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, представленных в **таблице 1**.

[0013] Согласно отдельным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 34 и 58, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0014] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0015] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18, 34/42 и 58/66.

[0016] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 40 и 64, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0017] В отдельных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16/24, 40/48 и 64/72.

[0018] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36 и 60, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 38 и 62, или по существу схожую с ними последовательность,

обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0019] Некоторые неограничивающие иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению включают первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24; 36-38-40-44-46-48; и 60-62-64-68-70-72.

[0020] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 26 и 50, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0021] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0022] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18, 26/42 и 50/66.

[0023] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 32 и 56, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0024] В отдельных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/24, 32/48 и 56/72.

[0025] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 28 и 52, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 30 и 54, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0026] Некоторые неограничивающие иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению включают второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24; 28-30-32-44-46-48; и 52-54-56-68-70-72.

[0027] В связанном варианте осуществления изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в последовательностях варибельной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18, 26/42 и 50/66.

[0028] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены молекулы

нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR биспецифичных антигенсвязывающих молекул анти-CD28/анти-PSMA, раскрытых в настоящем документе, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в **таблице 1** в настоящем документе, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более полинуклеотидных последовательностей, представленных в **таблице 1**, в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты согласно изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также охватываются изобретением, как и способы получения антител путем культивирования указанных клеток-хозяев в условиях, позволяющих получать антитела и выделять полученные антитела.

[0029] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, где любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают CD28, объединен, связан или иным образом ассоциирован с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают PSMA, с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, связывающей CD28 и PSMA.

[0030] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. Для некоторых областей применения может быть полезной модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозный фрагмент, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Для других областей применения может быть осуществлена модификация галактозилирования, чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

[0031] В еще одном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA, как раскрыто в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретения представлена композиция, представляющая собой комбинацию биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA и второго терапевтического агента. В одном из вариантов осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который может с пользой применяться в комбинации с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой анти-CD28/анти-PSMA. Примеры агентов, которые могут с пользой применяться в комбинации с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой анти-CD28/анти-PSMA, подробно обсуждаются в других местах в настоящем документе.

[0032] В еще одном аспекте изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA

согласно изобретению, где указанные терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащий биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA согласно настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту.

[0033] Настоящее изобретение также включает применение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией PSMA или вызываемого ею.

[0034] В еще одном аспекте изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению, где указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA применяют в комбинации с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (например, анти-CD28/анти-PSMA в комбинации с антителами анти-CD3/анти-PSMA).

[0035] В еще одном аспекте изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению, где указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA применяют в комбинации с ингибитором контрольной точки, нацеленным на PD-1 или CTLA-4 (например, анти-CD28/анти-PSMA в комбинации с антителами к PD-1).

[0036] В еще одном аспекте изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению, где указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA применяют в комбинации с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (например, анти-CD28/анти-PSMA в комбинации с биспецифичными антителами анти-CD3/анти-PSMA), и ингибитором контрольной точки, нацеленным на PD-1 или CTLA-4 (например, анти-CD28/анти-PSMA в комбинации с антителами к PD-1).

[0037] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0038] На **фиг. 1** схематически показана структура иллюстративного биспецифичного антитела к CD28/PSMA.

[0039] **Фиг. 2** представляет собой график, демонстрирующий ингибирование роста опухоли в генетически модифицированных линиях клеток с введенной экспрессией костимулирующего лиганда. Три линии опухолевых клеток, B16F10.9, EL4 и MC 38, были генетически модифицированы для экспрессии костимулирующего лиганда или GFP в

качестве контроля. **Фиг. 2** представляет собой график, демонстрирующий процент (%) выживаемости. Мышей умерщвляли, когда опухоли вырастали до размера, превышающего 2000 мм<sup>3</sup>.

[0040] **Фиг. 3** схематически показан исходный и генетически модифицированный биоанализ для исследования биспецифичных антител к PSMAxCD28.

[0041] На **фиг. 4А** и **4В** показано, что активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток и генетически модифицированных клеток JRT3.T3/ 1G4/hCD28 усиливалась под воздействием анти-hPSMA x hCD28 в условиях первичной стимуляции (REGN2281) и PSMA, экспрессируемого на клетках HEK293/hCD20.

[0042] На **фиг. 5А-5Н** показано, что в генетически модифицированных линиях клеток с введенным PSMA биспецифичные антитела к PSMAxCD28 усиливают активацию Т-клеток в условиях стимуляции TCR биспецифичными антителами к CD20xCD3.

[0043] На **фиг. 5А** схематически показан механизм действия биспецифичных антител.

[0044] **Фиг. 5В** представляет собой график, демонстрирующий количественную оценку отношения флуоресценции CD28 внутри иммунологического синапса и за его пределами. Генетически модифицированные PSMA клетки-мишени (HEK293) и Т-клетки человека Jurkat культивировали совместно с флуоресцентно мечеными биспецифичными антителами (анти-PSMAxCD28, анти-CD20xCD3) в течение 1 часа при 37 °С, осторожно фиксировали и окрашивали антителом к CD28. Количество проанализированных клеток в каждой группе указано на гистограмме.

[0045] На **фиг. 5С** и **5D** показана пролиферация Т-клеток человека, культивированных с генетически модифицированными PSMA клетками-мишенями. Показанные данные представляют собой среднее значение ± SEM (стандартная ошибка среднего). Данные относятся к по меньшей мере двум (2) экспериментам.

[0046] На **фиг. 5С** представлен график, демонстрирующий титрование дозы CD20xCD3 в присутствии 0,5 нМ изотипического контроля hIgG4s или PSMAxCD28.

[0047] На **фиг. 5D** представлен график, демонстрирующий титрование дозы PSMAxCD28 или указанных контролей в присутствии 5 пМ изотипического контроля hIgG4s или CD20xCD3.

[0048] **Фиг. 5Е-5G** представляют собой графики, демонстрирующие пролиферацию и высвобождение цитокинов Т-клетками человека, культивированными с генетически модифицированными ТАА (PSMA или CD20) клетками-мишенями, как указано в верхней части панели, в присутствии 5 пМ изотипического контроля hIgG4s (нижняя панель каждой фигуры) или CD20xCD3 (верхняя панель каждой фигуры). Данные представляют собой среднее значение ± SEM. Данные относятся к по меньшей мере трем (3) экспериментам.

[0049] **Фиг. 5Е** представляет собой график, демонстрирующий пролиферацию.

[0050] **Фиг. 5F** представляет собой график, демонстрирующий высвобождение IL-2.

[0051] **Фиг. 5G** представляет собой график, демонстрирующий высвобождение IFN $\gamma$ .

[0052] **Фиг. 5H** представляет собой график, демонстрирующий, что биспецифичные антитела к PSMAxCD28 и к PSMAxCD3 могут одновременно связываться с клетками, экспрессирующими PSMA. Клетки 22RV1 предварительно инкубировали в течение 30 минут при 4°C в буфере для проточной цитометрии (PBS+1%FBS) с 20 мг/мл PSMAxCD3 или 20 мг/мл антитела к PSMA, несущего плечо к PSMA, аналогичное содержащемуся в биспецифичном PSMAxCD28. После инкубации клетки промывали буфером для проточной цитометрии и инкубировали в течение 20 минут при 4 °C с 5 мг/мл PSMAxCD28, напрямую меченого Alexa647. После инкубации клетки промывали, повторно суспендировали в буфере для проточной цитометрии и анализировали методом проточной цитометрии.

[0053] На **фиг. 6A** и **6B** показано, что анти-PSMAxCD28 усиливало цитотоксическую активность анти-PSMAxCD3 в присутствии клеток карциномы предстательной железы и Т-клеток человека или яванского макака.

[0054] На **фиг. 7A-7H** представлены графики, демонстрирующие, что в линиях раковых клеток с эндогенным PSMA биспецифичные антитела к PSMAxCD28 усиливают активацию Т-клеток в условиях стимуляции TCR биспецифичными антителами к PSMAxCD3. На **фиг. 7A-7D** Т-клетки человека культивировали с раковыми клетками-мишенями с эндогенной экспрессией PSMA (линия рака предстательной железы C4-2) и указанными биспецифичными антителами в течение 96 часов.

[0055] **Фиг. 7A** представляет собой график, демонстрирующий уничтожение опухолевых клеток. Показанные данные представляют собой процент жизнеспособных клеток.

[0056] **Фиг. 7B** представляет собой график, демонстрирующий высвобождение  $IFN\gamma$ .

[0057] На **фиг. 7C** представлены графики, демонстрирующие количество CD4 Т-клеток и частоту встречаемости CD25<sup>+</sup> клеток в виде процента от CD4 Т-клеток.

[0058] На **фиг. 7D** представлены графики, демонстрирующие количество CD8 Т-клеток и частоту встречаемости CD25<sup>+</sup> клеток в виде процента от CD8 Т-клеток.

[0059] На **фиг. 7E-7G** Т-клетки яванского макака культивировали с раковыми клетками с эндогенной экспрессией PSMA (линия рака предстательной железы C4-2) и указанными биспецифичными антителами в течение 96 часов.

[0060] **Фиг. 7E** представляет собой график, демонстрирующий уничтожение опухолевых клеток. Показанные данные представляют собой процент жизнеспособных клеток.

[0061] На **фиг. 7F** представлены графики, демонстрирующие количество CD4 Т-клеток и частоту встречаемости CD25<sup>+</sup> клеток в виде процента от CD4 Т-клеток.

[0062] На **фиг. 7G** представлены графики, демонстрирующие количество CD8 Т-клеток и частоту встречаемости CD25<sup>+</sup> клеток в виде процента от CD8 Т-клеток.

[0063] На **фиг. 7H** представлен график, демонстрирующий связывание антител с клеточными мишенями, измеренное с помощью проточной цитометрии.

[0064] На **фиг. 8** показано сравнение свойств суперагониста TGN и антитела к CD28

согласно изобретению.

[0065] На **фиг. 9А** и **9В** представлены графики и точечные диаграммы, демонстрирующие, что биспецифичное антитело к PSMAxCD28 усиливает противоопухолевый иммунитет посредством PSMAxCD3 и индуцированной активации Т-клеток. Опухолевые клетки MC38/hPSMA подкожно имплантировали гуманизированным мышам hCD3/hCD28/hPSMA. Мышам вводили указанные биспецифичные антитела в дозе 5 мг/кг в 0, 3 и 7 день.

[0066] На **фиг. 9А** показана динамика объемов опухолей. Значения представляют собой среднее значение  $\pm$  SEM и относятся к трем (3) экспериментам с 3-7 мышами на группу. Значения Р рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  и \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

[0067] На **фиг. 9В** представлены графики, демонстрирующие процент клеток в каждом кластере из каждой группы лечения (верхняя панель); наложение указанного кластера на график viSNE (нижняя панель).

[0068] На **фиг. 9С** и **9D** представлены гистограммы, демонстрирующие, что биспецифичное антитело к PSMAxCD28 усиливает высвобождение цитокинов, индуцированное PSMAxCD3. У мышей брали кровь на сывороточные уровни цитокинов через 4 часа после введения дозы в 0 день. Статистическую значимость рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа по сравнению с изотипом \*\* $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,0001$ .  $n=7$  мышей на группу. Данные относятся к 3 экспериментам.

[0069] На **фиг. 9Е** представлен график и точечная диаграмма, демонстрирующие, что биспецифичное антитело к PSMAxCD28 усиливает активацию Т-клеток, индуцированную PSMAxCD3.

[0070] На **фиг. 10** показано, что биспецифичные антитела к PSMA x CD28 или родительские двухвалентные антитела к CD28 не индуцируют продукцию цитокинов в сыворотке у гуманизированных мышей CD3/CD28/PSMA.

[0071] На **фиг. 11** показано, что лечение суперагонистом к CD28 вызывало цитокиновый ответ через 4 часа у мышей NSG с привитыми МНПК, в отличие от антитела к CD28 mAb14226P2.

[0072] На **фиг. 12** показан потенциально более безопасный токсикологический профиль костимулирующих биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению. Анти-CD28 x анти-PSMA не вызывало цитокинового ответа, в отличие от анти-CD3 x анти-PSMA.

[0073] На **фиг. 13А** и **13В** показано, что PSMA x CD28 не демонстрировало продукцию цитокинов или маргинации Т-клеток по сравнению с PSMA x CD3 и суперагонистом к CD28. LLOQ: «нижний предел количественного определения».

[0074] На **фиг. 14** и **17** показано, что TSAxCD28 и блокада PD-1 активируют TCR/CD3 и CD28 на Т-клетках в месте опухоли. На **фиг. 15, 16** и **18** показано, что биспецифик TSAxCD28 и блокада PD-1 синергетически способствуют активации Т-клеток in vitro. На **фиг. 14-18** Т-клетка (Jurkat/PD-1) и клетка-мишень (Raji WT) конъюгируются в

присутствии неблокирующего mAb к PD-1 (NB mAb к PD-1) или блокатора (mAb к PD-1) и биспецифика CD20xCD3.

[0075] На **фиг. 14** представлены гистограммы, демонстрирующие количественную оценку локализации PD-1 и CD28 в иммунологическом синапсе. Статистическую значимость рассчитывали с помощью непарного t-критерия (незначимо, ns). Для количественной оценки локализации PD-1 и CD28 в иммунологическом синапсе получали изображения конъюгатов Т-клеток (Jurkat/PD-1) и клеток-мишеней (Raji WT) в присутствии неблокирующего mAb к PD-1 (NB mAb к PD-1) или блокатора (mAb к PD-1) и биспецифичного антитела к CD20xCD3. MAb к PD-1 напрямую метили Alexa647, биспецифичное антитело к CD20xCD3 напрямую метили Alexa488, mAb к CD28 напрямую метили PE, а ядра окрашивали Hoechst 33342 (изображения не показаны).

[0076] На **фиг. 15** представлены гистограммы, демонстрирующие количественную оценку локализации PD-1 и CD28 в иммунологическом синапсе. Статистическую значимость рассчитывали с помощью непарного t-критерия ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Для количественной оценки локализации PD-1 и CD28 в иммунологическом синапсе получали изображения конъюгатов Т-клеток (Jurkat/PD-1) и клеток-мишеней (Raji/PD-L1) в присутствии неблокирующего mAb к PD-1 (NB mAb к PD-1) или блокатора (mAb к PD-1) и биспецифичного антитела к CD20xCD3. MAb к PD-1 напрямую метили Alexa647 (показано красным), CD20xCD3 напрямую метили Alexa488 (показано зеленым), mAb к CD28 напрямую метили PE (показано синим), а ядра окрашивали Hoechst 33342 (показано серым). Пунктирные линии представляют собой контуры клеток, нарисованные на основе светлопольного изображения.

[0077] На **фиг. 16** показан процент (%) жизнеспособности клеток 22RV1-PDL1 через 96 часов.

[0078] **Фиг. 17** представляет собой график, демонстрирующий уровни IFN $\gamma$  в супернатанте через 96 часов.

[0079] **Фиг. 18** представляет собой график, демонстрирующий высвобождение IL-2 через 96 часов.

[0080] На **фиг. 19A-19D** показано, что экспрессия лиганда CD28 (CD86) на опухолевых клетках действует синергетически с лечением молекулой к PD1 в отношении индукции опосредованного CD8 противоопухолевого иммунитета. Опухолевые клетки MC38 трансдуцировали лигандом CD28, CD86 (MC38/CD86) или пустым векторным контролем (MC38/EV). Мышам WT C57BL6 первоначально имплантировали  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток на мышь и вводили mAb к PD-1 или крысиный изотипический контроль в дозе 5 мг/кг в 0, 3, 7, 10 и 14 день после имплантации опухоли.

[0081] На **фиг. 19A** показана динамика среднего объема опухоли. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критериев множественного сравнения Тьюки.

[0082] На **фиг. 19B** показана динамика выживаемости (процент мышей с опухолями

<2000 мм<sup>3</sup>). Статистическую значимость на 60-й день после имплантации определяли с помощью лорангового критерия (Кокса-Мантеля).

[0083] На **фиг. 19С** мышам вводили антитело, истощающее популяцию CD8 (истощение CD8), или изотипический контроль (без истощения). Показана динамика среднего объема опухоли при истощении CD8 (пунктирные линии) и в отсутствие истощения (сплошные линии) +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критериев множественного сравнения Тьюки.

[0084] На **фиг. 19D** показаны повторные имплантаты опухолей (повторная провокация опухолевыми клетками) у мышей без опухолей, которым имплантировали MC38/CD86 и проводили лечение mAb к PD1.

[0085] На **фиг. 19A-19D** показаны данные из 1 эксперимента с 10 мышами на группу. Данные относятся к по меньшей мере 4 отдельным экспериментам. Указана статистическая значимость (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 и \*\*\*\*p<0,0001).

[0086] На **фиг. 20, 21A, 22, 24 и 25** показано, что PSMAxCD28 действует синергетически с лечением mAb к PD1 в отношении индукции противоопухолевого иммунитета. Опухолевые клетки MC38 /hPSMA подкожно имплантировали мышам hCD3/hCD28/hPSMA. Биспецифичное антитело к PSMAxCD28, mAb к PD-1 или крысиный изотипический контроль IgG2a вводили в качестве монотерапии или в комбинации путем внутрибрюшинной инъекции по 5 мг/кг каждого. На **фиг. 21B и 21C** показано, что комбинация PSMAxCD28 и mAb к PD-1 увеличивает частоту встречаемости опухолеспецифичных Т-клеток. На **фиг. 23A и 23B** показано, что PSMA x CD28 действует синергетически с лечением антителом к PD1 в отношении индукции внутриопухолевых, но не селезеночных или системных цитокинов.

[0087] На **фиг. 20A-20E** показано, что немедленное лечение антителом анти-PSMA x анти-CD28 усиливает иммунитет в месте опухоли и действует синергетически с антителами к PD-1, способствуя отторжению опухоли. На **фиг. 20A** показана динамика среднего объема опухоли. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критериев множественного сравнения Тьюки (\*\*, p<0,001 и \*\*\*\*, p<0,0001). На **фиг. 20B** показана динамика выживаемости (мышей с опухолями >2000 мм<sup>3</sup> умерщвляли). Статистическую значимость определяли с помощью лорангового критерия (Кокса-Мантеля) (\*\*, p<0,01). На **фиг. 20C** показан средний объем опухоли на 21 день после имплантации. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Холма-Сидака (\*\*\*\*, p<0,0001). На **фиг. 20D** приведена таблица с объемами опухолей (мм<sup>3</sup>) на 21 день после имплантации. На **фиг. 20E** приведена таблица с количеством мышей без опухолей на группу, относящаяся к 6 отдельным экспериментам.

[0088] На **фиг. 21A** показана повторная провокация опухолевыми клетками у мышей

без опухолей, ранее получавших комбинацию PSMAxCD28 и mAb к PD1. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Данные относятся к 4 экспериментам.

[0089] На **фиг. 21В** показаны опухолевые клетки MC38/PSMA, имплантированные гуманизированным мышам CD3/CD28/PSMA, которым вводили изотипический контроль, PSMAxCD28, mAb к PD1 или комбинацию в дозе 5 мг/кг на 10 и 14 день после имплантации. Селезенки собирали на 17 день. Спленоциты культивировали в течение ночи в Т-клеточной среде с 10 мг/мл пептида (p15E или OVA) и 2 мг/мл антитела к CD28. После инкубации в течение ночи проводили внутриклеточное окрашивание цитокинов в соответствии со стандартными процедурами.

[0090] На **фиг. 21С** показано, что мыши без опухолей, получавшие лечение анти-CD28 x PSMA и антителом к PD1, но не анти-CD28 x PSMA и анти-CD3 x PSMA, отторгли повторные опухоли.

[0091] На **фиг. 22А-22D, 24 и 25** показана схема отсроченного/терапевтического лечения (дозирование обозначено стрелками; **фиг. 22А и 22В** на 9, 16 и 22 день; **фиг. 24 и 25** на 7, 11 и 14 день).

[0092] На **фиг. 22А** показана динамика среднего объема опухоли. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критериев множественного сравнения Тьюки. Данные относятся к 3 экспериментам.

[0093] На **фиг. 22В** показаны селезеночные и внутриопухолевые цитокины *ex vivo*. Точки представляют собой данные от отдельных мышей. Планка представляет собой среднее значение +/- SEM.

[0094] На **фиг. 22С** показан средний размер опухоли на 20 день.

[0095] На **фиг. 22D** показана выживаемость мышей, получавших разные виды лечения.

[0096] На **фиг. 23А и 23В** показано, что PSMA x CD28 действует синергетически с лечением антителом к PD1 в отношении индукции внутриопухолевых, но не селезеночных или системных цитокинов.

[0097] Данные на **фиг. 23А** аналогичны **фиг. 22В**. Селезеночные и внутриопухолевые цитокины *ex vivo*. Точки представляют собой данные от отдельных мышей. Планка представляет собой среднее значение +/- SEM.

[0098] На **фиг. 23В** трижды гуманизированным мышам CD3/CD28/PSMA имплантировали MC38/hPSMA и вводили указанное антитело в дозе 5 мг/кг в 0 день. У мышей брали кровь и собирали сыворотку через 4 часа после введения дозы. На **фиг. 23А и 23В** статистическую значимость рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критериев множественного сравнения Тьюки. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$

[0099] На **фиг. 24** показана экспрессия PD1 на субпопуляциях Т-клеток из дренирующего лимфатического узла (dLN), селезенки (Sp) и опухоли (Tu). Точки представляют собой данные от отдельных мышей. Планка представляет собой среднее

значение +/- SEM.

[00100] На **фиг. 25** показана частота встречаемости CD8 Т-клеток в С1 и С2 из указанных групп лечения.

[00101] Данные на каждой из **фиг. 22В, 24 и 25** относятся к 1 эксперименту. **Фиг. 22В и 24** n=4-6 мышей на группу. **Фиг. 25** n=10 мышей на группу.

[00102] На **фиг. 26А-26С и 27** показано, что ТААхCD28 по отдельности или в комбинации с терапией PD1 не индуцирует системную активацию Т-клеток по сравнению с суперагонистом к CD28 у яванских макаков. Яванским макакам вводили разовую дозу биспецификов в указанной дозе (1 или 10 мг/кг, как указано). Время относится к периоду после введения дозы (ч).

[00103] На **фиг. 26А** показаны сывороточные цитокины.

[00104] На **фиг. 26В** показано относительные количества Т-клеток в периферической крови.

[00105] На **фиг. 26С** показана частота встречаемости Ki67<sup>+</sup> и ICOS<sup>+</sup> Т-клеток (% от CD3).

[00106] На **фиг. 26А-26С** значения представляют собой среднее значение +/- SEM. N=3 животных на группу.

[00107] На **фиг. 27** показано, что трижды гуманизированным мышам CD3/CD28/PSMA вводили разовую дозу антитела (0,25 или 2,5 мг/кг, как указано). У мышей брали кровь и собирали сыворотку через 4 часа (0 день) после введения дозы. Статистическую значимость рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Холма-Сидака. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001

[00108] На **фиг. 28** показано, что PSMA x CD28 +/- PD1 не повышали сывороточные уровни цитокинов у мышей с опухолями.

[00109] На **29А и 29В** показано, что PSMAxCD28 по отдельности или в комбинации с mAb к PD1 демонстрируют безопасный цитокиновый профиль in vivo у мышей без опухолей. Данные аналогичны представленным на **фиг. 27**. Трижды гуманизированным мышам CD3/CD28/PSMA вводили разовую дозу антитела (0,25 или 2,5 мг/кг, как указано). У мышей брали кровь и собирали сыворотку через 4 часа (0 день) и 72 часа (3 день) после введения дозы. Статистическую значимость рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Холма-Сидака. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00110] Перед прочтением описания настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается определенными описанными методами и экспериментальными условиями, поскольку такие методы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания частных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться

только прилагаемой формулой изобретения.

[00111] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В контексте настоящего документа термин «приблизительно» применительно к конкретному приведенному числовому значению означает, что указанное значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[00112] Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, предпочтительные методы и материалы описаны далее. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

#### Определения

[00113] Выражение «CD28» в контексте настоящего документа относится к антигену, экспрессируемому на Т-клетках в качестве костимулирующего рецептора. CD28 человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, и/или имеет аминокислотную последовательность, соответствующую регистрационному номеру NP\_006130.1. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе подразумевают ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат виду, отличному от человека. Таким образом, выражение «CD28» означает CD28 человека, если не указано, что он принадлежит к виду, отличному от человека, например, «мышинный CD28», «обезьяний CD28» и т. д.

[00114] В контексте настоящего документа термин «антитело, связывающее CD28» или «антитело к CD28» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают мономерный CD28, а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают димерный CD28. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связывать растворимый CD28 и/или CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности. Растворимый CD28 включает природные белки CD28, а также рекомбинантные варианты белков CD28, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD28, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом не связаны с клеточной мембраной.

[00115] В контексте настоящего документа выражение «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» означает один или более белков CD28, которые экспрессируются на клеточной поверхности *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка CD28 находится снаружи внеклеточной стороны клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает белки CD28, содержащиеся в контексте функционального Т-клеточного

костимулирующего рецептора в мембране клетки. Выражение «CD28, экспрессируемый на поверхности клетки» включает белок CD28, экспрессируемый как часть гомодимера на поверхности клетки. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD28. В качестве альтернативы, «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD28 человека на своей поверхности, но была искусственно генетически модифицирована для экспрессии CD28 на своей поверхности.

[00116] В контексте настоящего документа выражение «антитело к CD28» включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD28, и второе плечо, которое связывает второй антиген (мишень), при этом плечо к CD28 содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в таблице 1 в настоящем документе. Примеры биспецифичных антител к CD28 описаны в других местах в настоящем документе. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[00117] Термин «антитело» в контексте настоящего документа означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, CD28). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи - соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L1</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела к CD28 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека, или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

[00118] Термин «антитело» в контексте настоящего документа также включает

антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящей стандартной методики, такой как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[00119] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты F<sub>d</sub>; (iv) фрагменты F<sub>v</sub>; (v) одноцепочечные молекулы F<sub>v</sub> (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные рекогниционные единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), например, пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие генетически модифицированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т. д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены акул IgNAR также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего документа.

[00120] Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая прилегает к одной или более каркасным последовательностям или находится в рамке считывания с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V<sub>H</sub>, ассоциированный с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

[00121] В отдельных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно

связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут содержаться в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i)  $V_H-C_{H1}$ ; (ii)  $V_H-C_{H2}$ ; (iii)  $V_H-C_{H3}$ ; (iv)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}$ ; (v)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vi)  $V_H-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_{H1}$ ; (ix)  $V_L-C_{H2}$ ; (x)  $V_L-C_{H3}$ ; (xi)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}$ ; (xii)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L-C_{H2}-C_{H3}$ ; и (xiv)  $V_L-C_L$ . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

[00122] Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый из них способен специфично связываться со своим антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая иллюстративные форматы биспецифичных антител, раскрытые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием стандартных методов, доступных в данной области техники.

[00123] Антитела согласно настоящему изобретению могут выполнять свою функцию посредством комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). «Комплементзависимая цитотоксичность» (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток посредством антитела согласно изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым приводят к ее лизису. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области техники. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337, и Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652- 656). Константная область антитела важна для способности антитела

фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательна ли для данного антитела опосредовать цитотоксичность.

[00124] В отдельных вариантах осуществления изобретения антитела к CD28 согласно изобретению (моноспецифичные или биспецифичные) представляют собой антитела человека. Подразумевается, что термин «антитело человека» в контексте настоящего документа включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «антитело человека» в контексте настоящего документа не подразумевает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

[00125] Антитела согласно изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, представлять собой рекомбинантные антитела человека. Подразумевается, что термин «рекомбинантное антитело человека» в контексте настоящего документа включает все антитела человека, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные у животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с получением других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в отдельных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования трансгенного по последовательностям Ig человека животного, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека и родственны им, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

[00126] Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с различиями шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную

четырёхцепочечную конструкцию массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[00127] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, не ограничиваясь перечисленным, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира Ig человекаG4 может значительно уменьшить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира Ig человекаG1. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в областях шарнира, CH2 или CH3, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[00128] Антитела согласно изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело» в контексте настоящего документа означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из по меньшей мере одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или извлечено из по меньшей мере одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» в контексте настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно отдельным вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[00129] Настоящее изобретение также включает антитела с одним плечом, связывающие CD28. В контексте настоящего документа термин «антитело с одним плечом» означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Антитела с одним плечом согласно настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 2.

[00130] Антитела к CD28 в настоящем документе или их антигенсвязывающие домены могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антигенсвязывающие белки или антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой

линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие домены, полученные из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в которых одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, содержащих одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В отдельных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было первоначально получено антитело). Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие домены согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко проверены на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т. д. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим образом, охватываются настоящим изобретением.

[00131] Настоящее изобретение также включает антитела к CD28 и антигенсвязывающие молекулы, содержащие варианты любой из аминокислотных

последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные варианты, включенные в данный аспект изобретения, включают варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие молекулы к CD28, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1 в настоящем документе.

[00132] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические действия. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[00133] Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными inserциями или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место идентичность нуклеотидных оснований нуклеотидной последовательности, составляющая по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%, при измерении с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по существу идентичная референсной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый указанной референсной молекулой нуклеиновой кислоты.

[00134] Применительно к полипептидам термин «по существу сходство» или «по существу схожий» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим

боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена по существу не приводит к изменению функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00135] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает схожие последовательности, применяя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами - программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданной и найденной последовательностями (см. Pearson (2000) выше). Еще одним предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.*

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

#### Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы

[00136] Антитела согласно настоящему изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Антитела к CD28 согласно настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, в целях получения биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй специфичностью связывания.

[00137] Подразумевается, что использование выражения «антитело к CD28» в настоящем документе включает как моноспецифичные антитела к CD28, так и биспецифичные антитела, содержащие CD28-связывающее плечо и второе плечо, связывающее антиген-мишень. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает CD28 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным к антигену-мишени. Антиген-мишень, с которым связывается другое плечо биспецифичного антитела к CD28, может представлять собой любой антиген, экспрессируемый на или вблизи клетки, ткани, органа, микроорганизма или вируса, против которых необходимо вызвать направленный иммунный ответ. CD28-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 1 в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления CD28-связывающее плечо связывает CD28 человека и индуцирует пролиферацию Т-клеток человека.

[00138] В контексте биспецифичных антител согласно настоящему изобретению, где одно плечо антитела связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень, указанный антиген-мишень может представлять собой опухолеассоциированный антиген, такой как PSMA.

[00139] Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают CD28 и PSMA. Такие молекулы могут называться в настоящем документе, например, биспецифичными молекулами «анти-CD28/анти-PSMA», или «анти-CD28xPSMA», или «CD28xPSMA», или «анти-PSMA/анти-CD28», или «анти-PSMAxCD28», или «PSMAxCD28», или с использованием другой подобной терминологии.

[00140] Термин «PSMA» в контексте настоящего документа относится к белку PSMA человека, если не указано, что он принадлежит к отличным от человека видам

(например, «мышиный PSMA», «обезьяний PSMA» и т. д.). Белок PSMA человека имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, и/или имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую регистрационному номеру в NCBI NP\_004467.1.

[00141] Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления, показанным на **фиг. 1**, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела) могут иметь эффекторное плечо и нацеливающее плечо. Эффекторное плечо может представлять собой первый антигенсвязывающий домен (например, антитело к CD28), который связывается с антигенами на эффекторных клетках (например, Т-клетках). Нацеливающее плечо может представлять собой второй антигенсвязывающий домен (например, антитело к PSMA), который связывается с антигенами на клетках-мишенях (например, опухолевых клетках). Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления эффекторное плечо связывается с CD28, а нацеливающее плечо связывается с PSMA. Биспецифичная молекула к CD28/PSMA может передавать костимулирующий сигнал эффекторным клеткам (например, Т-клеткам). Эффекторное плечо неспособно стимулировать Т-клетки в отсутствие кластеризации. При кластеризации эффекторное плечо само по себе незначительно стимулирует Т-клетки. В комбинации с нацеливающим плечом эффекторное плечо стимулирует Т-клетки. Плечо, нацеленное на опухоль, может иметь несовершенную специфичность к опухоли. Антиген, который является мишенью для нацеливающего плеча (например, PSMA), может экспрессироваться на части опухолевых клеток. Специфичность плеча, нацеленного на опухоль, может быть увеличена путем перекрытия комбинацией с биспецифичными антигенсвязывающими молекулами к CD3 (например, биспецифичным антителом к CD3/PSMA).

[00142] В контексте настоящего документа выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарности области (CDR), которая по отдельности или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфично связывается с определенным антигеном. В отдельных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела в соответствии с определениями этих терминов в других местах в настоящем документе.

[00143] В контексте настоящего документа документе выражение «биспецифичная антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифичной антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая сама по себе или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфично связывается с определенным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфично связывает первый антиген (например, CD28), а

второй антигенсвязывающий домен специфично связывает второй, другой антиген (например, PSMA).

[00144] В отдельных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домены (например, биспецифичного антитела), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «D1», а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «D2». Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе D1-HCDR1, D1-HCDR2 и D1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе D2-HCDR1, D2-HCDR2 и D2-HCDR3.

[00145] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть непосредственно или опосредованно связаны друг с другом с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена может быть соединен с отдельным мультимеризирующим доменом. Ассоциация одного мультимеризирующего домена с другим мультимеризирующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым обеспечивая образование биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. В контексте настоящего документа термин «мультимеризирующий домен» означает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, обладающие способностью ассоциировать со вторым мультимеризирующим доменом такой же или подобной структуры или состава. Например, мультимеризирующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H3</sub> иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризирующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>), например, Fc-домен IgG, выбранного из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в группе каждого изоформы.

[00146] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению в типичном случае содержат два мультимеризирующих домена, например, два Fc-домена, каждый из которых в отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризирующие домены могут относиться к одному и тому же изоформе IgG, например, к IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В качестве альтернативы, первый и второй мультимеризирующие домены могут относиться к разным изоформам IgG, например, к IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

[00147] В отдельных вариантах осуществления мультимеризирующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один цистеиновый остаток. В других вариантах осуществления мультимеризирующий домен представляет собой

цистеиновый остаток или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали.

[00148] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению может быть использован любой формат биспецифичных антител или технология. Например, антитело или его фрагмент, имеющие первую антигенсвязывающую специфичность, могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющими вторую антигенсвязывающую специфичность, в целях получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифичные форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной переменный домен (OVO)-Ig, квадрогибридому, «выступы во впадины», общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с взаимодействием по типу «выступы во впадины» и т. д.), CrossMab, CrossFab, (SEEO)body, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (OAF)-IgG двойного действия и биспецифичные форматы Mab<sup>2</sup> (обзор вышеуказанных форматов см., например, в Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и цитируемых в нем источниках).

[00149] В контексте биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению мультимеризующие домены, например, Fc-домены, могут содержать одно или более изменений аминокислот (например, инсерции, делеции или замены) по сравнению со встречающейся в природе версией Fc-домена дикого типа. Например, изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, приводящих к модифицированному Fc-домену, имеющему модифицированное связывающее взаимодействие (например, повышенное или пониженное) между Fc и FcRn. В одном из вариантов осуществления биспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, причем указанная модификация увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH составляет от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, LN/FIW или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/EID или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, UR/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или V); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 2591 (например, V2591) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например,

252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00150] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен  $C_{H3}$  и второй домен  $C_{H3}$  Ig, причем первый и второй домены  $C_{H3}$  Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и причем отличие по меньшей мере в одной аминокислоте снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, не имеющим отличия в аминокислоте. В одном из вариантов осуществления первый домен  $C_{H3}$  Ig связывает белок А, а второй домен  $C_{H3}$  Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Вторым  $C_{H3}$  может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; согласно Y436F EU). Другие модификации, которые могут содержаться во втором  $C_{H3}$ , включают: D16E, L 18M, N44S, K52N, V57M и V821 (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V4221 согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V821 (IMGT; N384S, K392N и V4221 согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V821 (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V4221 согласно EU) в случае антител IgG4.

[00151] В отдельных вариантах осуществления Fc-домен может быть химерным и содержать комбинацию последовательностей Fc, полученных от более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный Fc-домен может содержать часть или всю последовательность  $C_{H2}$ , полученную из области  $C_{H2}$  Ig человекаG1, Ig человекаG2 или Ig человекаG4, и часть или всю последовательность  $C_{H3}$ , полученную из Ig человекаG1, Ig человекаG2 или Ig человекаG4. Химерный Fc-домен может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области Ig человекаG1, Ig человекаG2 или Ig человекаG4, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью, полученной из шарнирной области Ig человекаG1, Ig человекаG2 или Ig человекаG4. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит, от N- к C-концу: [IgG4  $C_{H1}$ ] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4  $C_{H2}$ ] - [IgG4  $C_{H3}$ ]. Еще один пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит, от N- к C-концу: [IgG1  $C_{H1}$ ] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4  $C_{H2}$ ] - [IgG1  $C_{H3}$ ]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, описаны в заявке WO2014/022540 A1. Химерные Fc-домены, имеющие такое общее строение, и их варианты могут обладать измененным связыванием с Fc-рецептором, которое, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

### Варианты последовательностей

[00152] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в которых одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, содержащих одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В отдельных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии.

После получения антигенсвязывающие домены, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко проверены на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т. д. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных по этому общему принципу, охватываются настоящим изобретением.

[00153] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, где один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена по существу не приводит к изменению функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспарат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспарат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00154] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность HCVR, LCVR и/или CDR, по существу идентичную любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к

аминокислотной последовательности означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

[00155] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает схожие последовательности, применяя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами - программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданной и найденной последовательностями (см. Pearson (2000) выше). Еще одним предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

#### pH-зависимое связывание

[00156] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело к CD28 согласно настоящему изобретению может демонстрировать пониженное связывание с CD28 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В качестве альтернативы, антитела к PSMA согласно изобретению могут демонстрировать повышенное связывание с PSMA при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает значения pH менее приблизительно 6,2, например,

приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. В контексте настоящего документа выражение «нейтральный рН» означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный рН» включает значения рН, равные приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[00157] В некоторых случаях «пониженное связывание ... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» выражается посредством отношения значения  $K_D$  связывания антитела с его антигеном при кислом рН к значению  $K_D$  связывания антитела с его антигеном при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие «пониженное связывание с CD28 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» в контексте настоящего изобретения, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют отношение кислой/нейтральной  $K_D$ , равное приблизительно 3,0 или более. В отдельных иллюстративных вариантах осуществления отношение кислой/нейтральной  $K_D$  для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

[00158] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на предмет пониженного (или повышенного) связывания с определенным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

Антитела, содержащие варианты Fc

[00159] Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые повышают или понижают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие молекулы, содержащие мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 Fc-домена, где мутация(ии) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН составляет от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434

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

[00160] Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антитела, раскрытых в настоящем документе, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и антигенсвязывающих молекул

[00161] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 человека и/или PSMA с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 человека и/или PSMA со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных требуемых свойств нацеливания. Например, в контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень (например, PSMA), может быть желательно, чтобы плечо, связывающее антиген-мишень, связывало его с высокой аффинностью, а плечо к CD28 связывало CD28 только с умеренной или низкой аффинностью. Таким образом может быть достигнуто избирательное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, при одновременном предотвращении неизбирательного/нецелевого связывания CD28 и связанных с этим сопутствующих побочных действий.

[00162] Согласно отдельным вариантам осуществления настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD28 человека (например, при 25°C) с  $K_D$  менее чем приблизительно 210 нМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа согласно примеру 3 в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD28 с  $K_D$  менее чем приблизительно 150 нМ, менее чем приблизительно 130 нМ, менее чем приблизительно 120 нМ, менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ или менее чем приблизительно 30 нМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с

использованием формата анализа согласно примеру 3 в настоящем документе или по существу схожего анализа. В отдельных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD28 с  $K_D$  от приблизительно 30 нМ до приблизительно 207 нМ.

[00163] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ), превышающим приблизительно 3,5 минуты при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37 °C, например, с использованием формата анализа согласно примеру 3 в настоящем документе или по существу схожего анализа. В отдельных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD28 с  $t_{1/2}$  более чем приблизительно 5 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 200 минут, более чем приблизительно 300 минут, более чем приблизительно 400 минут, более чем приблизительно 500 минут, более чем приблизительно 600 минут, более чем приблизительно 700 минут, более чем приблизительно 800 минут, более чем приблизительно 900 минут, более чем приблизительно 1000 минут или более чем приблизительно 1200 минут при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37 °C, например, с использованием формата анализа согласно примеру 3 в настоящем документе или по существу схожего анализа.

[00164] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), способные одновременно связываться с CD28 человека и PSMA человека. Согласно отдельным вариантам осуществления биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению специфично взаимодействуют с клетками, экспрессирующими CD28 и/или PSMA. Степень, в которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD28 и/или PSMA, может быть оценена методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 4 в настоящем документе. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, специфично связывающие линии клеток человека, экспрессирующие CD28, но не PSMA (например, HEK293, генетически модифицированные для экспрессии CD28), и линии клеток карциномы предстательной железы человека, экспрессирующие PSMA, но не CD28 (например, C4-2). Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, связывающие любые из вышеупомянутых клеток и линий клеток со значением  $EC_{50}$  от приблизительно  $9,6 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $3,5 \times 10^{-10}$  или менее при определении с использованием анализа FACS согласно примеру 4 или по существу схожего анализа.

[00165] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным

антигенсвязывающим молекулам анти-CD28/анти-PSMA, которые индуцируют или увеличивают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD28xPSMA, которые индуцируют или увеличивают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 78 пМ при измерении в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, например, с использованием формата анализа согласно примеру 6 в настоящем документе (например, оценки степени уничтожения опухолевых клеток С4-2 МНПК человека в присутствии антител к CD28xPSMA) или по существу схожего анализа. В отдельных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (например, опосредованное МНПК уничтожение клеток С4-2) со значением  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 16 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5,0 пМ, менее чем приблизительно 4,0 пМ, менее чем приблизительно 3,0 пМ, менее чем приблизительно 2,5 пМ, менее чем приблизительно 2,0 пМ, менее чем приблизительно 1,5 пМ или менее чем приблизительно 1,45 пМ при измерении в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, например, с использованием формата анализа согласно примеру 6 в настоящем документе или по существу схожего анализа.

[00166] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, которые связываются с экспрессирующими CD28 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$  от 1,0 пМ до 1000 нМ. В отдельных вариантах осуществления биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA связываются с экспрессирующими CD28 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$  от 48 нМ до 180 нМ. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, которые связываются с экспрессирующими CD28 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$ , равным приблизительно 1 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 20 нМ, приблизительно 30 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 90 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 300 нМ, приблизительно 500 нМ, приблизительно 800 нМ, приблизительно 1000 нМ или более.

[00167] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, демонстрирующие одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (а) индукции пролиферации Т-клеток *in vitro* (см., например, пример 8 в настоящем документе); (b) активации Т-клеток, индукции повышающей регуляции CD25 и PD-1 в МНПК человека (см., например, пример 8 в настоящем документе); (с) повышения опосредованной Т-клетками человека

цитотоксичности в отношении линий клеток, экспрессирующих PSMA (см., например, пример 8 в настоящем документе); (d) индукции опосредованной наивными Т-клетками приматов цитотоксичности в отношении линий клеток, экспрессирующих PSMA (см., например, пример 8 в настоящем документе); (e) истощения опухолевых клеток у мышей (например, пример 10 в настоящем документе); (f) повышения элиминации опухоли у мышей (например, пример 10 в настоящем документе); (g) отсутствия индукции цитокинового шторма (например, пример 10 в настоящем документе); (h) отсутствия индукции системного действия Т-клеток у яванского макака (например, пример 11 в настоящем документе); (i) усиления влияния блокады PD-1 на индуцированное активацией Т-клеток уничтожение опухолевых клеток (например, пример 13 в настоящем документе); (j) усиления экспансии Т-клеток памяти (например, пример 13 в настоящем документе).

[00168] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, способные сокращать пул опухолевых клеток у субъекта (см., например, пример 8). Например, согласно отдельным вариантам осуществления предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA, где разовое введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг или менее) вызывает уменьшение количества опухолевых клеток у субъекта.

#### Картирование эпитопа и связанные технологии

[00169] Эпитоп на CD28 или PSMA, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD28 или белка PSMA. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD28 или PSMA. Антитела согласно изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в мономере CD28, или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух разных цепях CD28 димера CD28. Термин «эпитоп» в контексте настоящего документа относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут оказывать разные биологические действия. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[00170] Различные методики, известные специалистам в данной области техники,

могут быть использованы для определения того, «взаимодействует ли с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке антигенсвязывающий домен антитела. Иллюстративные методы, которые могут быть использованы для определения эпитопа или связывающего домена определенного антитела или антигенсвязывающего домена, включают, например, стандартный перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), точечный мутагенез (например, мутагенез с аланиновым сканированием, мутагенез с аргининовым сканированием и т. д.), блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), анализ с защитой от протеаз и анализ с использованием расщепления пептидов. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Еще одним методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, определяемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить протекание водородно-дейтериевого обмена на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгенодифракционный анализ кристаллической структуры также может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело.

[00171] Настоящее изобретение дополнительно включает антитела к CD28 и к PSMA, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 1 в настоящем документе). Аналогичным образом настоящее изобретение также включает антитела к CD28 и/или к PSMA, которые конкурируют за связывание с CD28 и/или PSMA с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антителами, содержащими любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 1 в настоящем документе).

[00172] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает PSMA человека, где указанный первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD28, что и любой из конкретных иллюстративных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов,

описанных в настоящем документе, и/или где указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на PSMA, что и любой из конкретных иллюстративных PSMA-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

[00173] Аналогичным образом настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает PSMA человека, где указанный первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 с любым из конкретных иллюстративных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или где указанный второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с PSMA с любым из конкретных иллюстративных PSMA-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

[00174] Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, что и референсная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, или конкурирует ли она с ней за связывание, используя стандартные методы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом на CD28 (или PSMA), что и референсная биспецифичная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, референсной биспецифичной молекуле сначала дают связываться с белком CD28 (или белком PSMA). Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой CD28 (или PSMA). Если исследуемое антитело способно связываться с CD28 (или PSMA) после насыщающего связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с эпитопом CD28 (или PSMA), отличным от связываемого референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой. С другой стороны, если исследуемое антитело неспособно связываться с молекулой CD28 (или PSMA) после насыщающего связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD28 (или PSMA), что и эпитоп, связанный референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой согласно изобретению. Затем может быть проведен дополнительный стандартный эксперимент (например, анализ мутаций и связывания пептида) для подтверждения того, связано ли фактически наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела со связыванием с тем же самым эпитопом, что и референсная антигенсвязывающая молекула, или отсутствие наблюдаемого связывания обусловлено стерическим блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого типа могут быть проведены с помощью ELISA, RIA, Вiасоге, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка

связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99% при измерении в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы считают, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Считают, что два антигенсвязывающих белка имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00175] Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, описанную выше методику определения связывания применяют в двух ориентациях: в первой ориентации референсной антигенсвязывающей молекуле дают связываться с белком CD28 (или белком PSMA) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой CD28 (или PSMA). Во второй ориентации исследуемому антителу дают связываться с молекулой CD28 (или PSMA) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания референсной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD28 (или PSMA). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD28 (или PSMA), то делают вывод, что исследуемое антитело и референсная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD28 (или PSMA). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, не обязательно должно связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело, но может стерически блокировать связывание референсного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул

[00176] Антигенсвязывающие домены, специфичные к конкретным антигенам, могут быть получены с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфичные к двум разным антигенам (например, CD28 и PSMA), можно соответствующим образом расположить друг относительно друга для получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению с использованием стандартных методов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифичных антител, которые могут применяться для конструирования биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, приведено в других местах в настоящем документе). В отдельных вариантах осуществления

один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью антител человека. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одна или более тяжелых и/или легких цепей биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. Используя технологию VELOCIMMUNE™ (или любую другую технологию получения антител человека), первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к определенному антигену (например, CD28 или PSMA), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Определяют характеристики антител и осуществляют их отбор по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышиные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью для создания полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

[00177] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул человека могут быть использованы генетически модифицированные животные. Например, может быть использована генетически модифицированная мышь, неспособная к реаранжировке и экспрессии эндогенной последовательности переменной области легкой цепи мышинового иммуноглобулина, при этом мышь экспрессирует только один или два человеческих переменных домена легкой цепи, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном мышинной константной области каппа в эндогенном мышинном локусе каппа. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, ассоциированные с идентичной легкой цепью, содержащей переменный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена человеческой переменной области легкой цепи. (Подробное обсуждение таких генетически модифицированных мышей и их использования для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул см., например, в заявке US 2011/0195454).

#### Биоэквиваленты

[00178] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но сохраняют способность связывать CD28 и/или PSMA. Такие варианты молекул содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антигенсвязывающих молекул. Аналогичным образом, последовательности ДНК согласно настоящему изобретению, кодирующие антигенсвязывающие молекулы, охватывают последовательности, содержащие одно или более добавлений, делеций или замен

нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антигенсвязывающую молекулу, которая по существу биоэквивалентна описанным антигенсвязывающим молекулам согласно изобретению. Примеры таких вариантных аминокислотных и ДНК-последовательностей обсуждались выше.

[00179] Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, биоэквивалентные любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе, так и в многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[00180] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

[00181] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз быть переведен с референсного продукта на биологический продукт и наоборот без ожидаемого увеличения риска побочных действий, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.

[00182] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством одного и того же механизма или механизмов действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

[00183] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Варианты оценки биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют динамику концентрации антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости; (b) тест *in vitro*, который был соотнесен с данными о биологической доступности у людей *in vivo* и позволяет в разумных пределах их прогнозировать; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют динамику соответствующего фармакологического действия разовой дозы антитела (или его мишени); и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливается безопасность,

эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[00184] Биоэквивалентные варианты иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, с помощью различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для проявления биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, могут быть подвергнуты делеции или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать иллюстративные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем документе, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или убирают гликозилирование.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами

[00185] Настоящее изобретение, согласно отдельным вариантами осуществления, относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD28 человека, но не с CD28 других видов. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с PSMA человека, но не с PSMA других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и с CD28 одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с PSMA человека и с PSMA одного или более видов, отличных от человека.

[00186] Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и/или PSMA человека, и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из CD28 и/или PSMA мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе. Например, в частном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD28 человека и CD28 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA человека.

Иммуноконъюгаты

[00187] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, разрушающий клетки. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, WO 05/103081).

## Терапевтический препарат и введение

[00188] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно изобретению составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих препаратов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти препараты включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа «масло в воде» и «вода в масле», эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00189] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, подлежащего лечению заболевания, состояний, способа введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. При применении биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению в терапевтических целях у взрослого пациента может быть предпочтительным внутривенное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, в разовой дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозировки и схемы введения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы могут быть определены опытным путем; например, можно контролировать течение заболевания пациента путем периодического обследования и корректировать дозу соответствующим образом. Кроме того, может быть осуществлено межвидовое масштабирование дозировок с использованием хорошо известных в данной области техники методов (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00190] Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы.

Композиция может быть введена любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.) и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

[00191] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению весьма подходящей является шприц-ручка. Такой шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке для доставки обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции из картриджа и его опустошения пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть использован повторно. В одноразовом шприце-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовый шприц-ручка приходит уже заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции устройство выбрасывают целиком.

[00192] Множество многоразовых шприцев-ручек и шприцев-тюбиков подходит для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и другие. Примеры одноразовых шприцев-ручек, подходящих для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), шприц-ручку PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и другие.

[00193] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления может быть использован насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В еще одном варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система с

контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, в результате чего требуется только доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

[00194] Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т. д. Эти инъекционные формы могут быть получены с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные формы могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т. д., которые могут быть использованы в сочетании с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, НСО-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые могут быть использованы в сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

[00195] Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственных формах в единичной дозе, выбранной таким образом, чтобы она вмещала дозу активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Содержащееся количество вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; предпочтительно, особенно в форме инъекции, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Виды терапевтического применения антигенсвязывающих молекул

[00196] Настоящее изобретение включает способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антитело к CD28 или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает CD28 и антиген-мишень (например, PSMA). Указанная терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, как раскрыто в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В контексте настоящего документа выражение «нуждающийся в этом

субъект» означает человека или животное, не являющееся человеком, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков рака (например, субъект с признаками опухоли или страдающий любым из видов рака, упомянутых ниже в настоящем документе), или которые иным образом получили бы пользу от ингибирования или снижения активности PSMA или сокращения пула PSMA+ клеток.

[00197] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) пригодны, среди прочего, для лечения любого заболевания или расстройства, при котором может оказать благоприятное действие стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа. В частности, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-PSMA согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или расстройства, связанного с экспрессией или активностью PSMA или пролиферацией PSMA+ клеток, или опосредованного ими. Механизмы действия, посредством которых осуществляются методы терапии согласно изобретению, включают уничтожение клеток, экспрессирующих PSMA, в присутствии эффекторных клеток, например, Т-клеток. Клетки, экспрессирующие PSMA, для ингибирования или уничтожения которых могут применяться биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению, включают, например, онкогенные клетки предстательной железы.

[00198] Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих при раке ободочной кишки, легкого, молочной железы, почки и подтипах рака мочевого пузыря. Согласно отдельным иллюстративным вариантам осуществления биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению применяют для лечения рака предстательной железы.

[00199] Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. В контексте настоящего документа термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после проведения противораковой терапии.

[00200] Согласно отдельным аспектам настоящего изобретения предложены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией PSMA (например, рака предстательной железы), включающие введение одной или более биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в других местах настоящего документа, субъекту после того, как было установлено, что указанный субъект является резистентным к другим видам противораковой терапии. Например, настоящее изобретение включает способы лечения рака предстательной железы, включающие введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-PSMA пациенту через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил стандартное лечение для пациентов, страдающих от рака, например, рака предстательной железы. В других

аспектах биспецифичную антигенсвязывающую молекулу согласно изобретению (биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA), содержащую Fc-домен IgG4, первоначально вводят субъекту в один или несколько моментов времени (например, для обеспечения устойчивого начального сокращения пула клеток рака предстательной железы) с последующим введением эквивалентной биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей другой домен IgG, такой как Fc-домен IgG1, в последующие моменты времени. Предполагается, что антитела анти-CD28/анти-PSMA согласно изобретению могут применяться в сочетании с другими биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, такими как биспецифичное антитело анти-PSMA/анти-CD3. Также предполагается, что биспецифичные антитела согласно изобретению будут применяться в сочетании с ингибиторами контрольной точки, например, нацеленными на PD-1 и CTLA-4, и другие мишени. Применение комбинации двух биспецифичных антител, нацеленных на один и тот же опухолевый антиген (например, PSMA), может обеспечить преимущества, но при этом один из биспецификов должен быть нацелен на CD3 на Т-клетках, а другой биспецифик должен быть нацелен на молекулу костимулятора, такую как CD28. Эта комбинация может применяться самостоятельно для усиления уничтожения опухолевых клеток или может применяться в комбинации с ингибитором контрольной точки.

#### Комбинированные терапии и препараты

[00201] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические препараты, содержащие любые из иллюстративных антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

[00202] Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые могут применяться в комбинации или которые могут быть введены в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, включают, например, химиотерапию, радиационную терапию, ингибиторы контрольных точек, нацеленные на PD-1 (например, антитело к PD-1, такое как пембролизумаб или ниволумаб; см. также US9987500), CTLA-4, LAG3, TIM3 и другие, костимулирующие агонистические двухвалентные антитела, нацеленные на такие молекулы, как GITR, OX40, 4-1BB и другие), биспецифичные антитела к CD3 (см., например, WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 и WO2018/058001A1), другие антитела, нацеленные на PSMA X CD3 (см., например, WO2017/023761A1), и другие костимулирующие биспецифичные антитела к CD28.

[00203] Другие агенты, которые могут оказать благоприятное действие при введении в комбинации с антителами согласно изобретению, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими

рецепторами. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-PSMA, как раскрыто в настоящем документе) также могут быть введены как часть схемы лечения, включающей одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из «ICE»: ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например, Etoporphos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); «DHAP»: дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозин-арабинозид, ara-C), цисплатин (например, Platinol®-AQ); и «ESHAP»: этопозид (например, Etoporphos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), высокие дозы цитарабина, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

[00204] Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в настоящем документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, кшПНК, пептитело, нанотело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные рекогниционные единицы). Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также могут быть введены и/или включены в состав комбинированного препарата с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВП (нестероидными противовоспалительными препаратами). Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также могут быть введены как часть схемы лечения, которая также включает радиационную терапию и/или традиционную химиотерапию, или лечение биологическим препаратом, включая ингибиторы контрольных точек или другие биспецифичные антитела.

[00205] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические препараты, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytosan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин,

даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дростанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (Taxotere™; Aventis, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги препаратов платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; препараты платины; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В это определение также включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

[00206] Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению (в контексте настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[00207] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержится в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других местах в настоящем документе.

#### Схемы введения

[00208] Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела к CD28 или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывает PSMA и CD28) могут быть введены субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего документа под «последовательным введением» подразумевается, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни с заданным промежутком (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, включающие последовательное введение пациенту разовой начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующими одной или более вторичными дозами указанной антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, с последующими одной или более третичными дозами указанной антигенсвязывающей молекулы.

[00209] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В отдельных вариантах осуществления, однако, количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, варьируют (например, корректируют в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в течение курса лечения. В отдельных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде «ударных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводят реже (например, «поддерживающие дозы»).

[00210] В одном из иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, через 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза» в контексте настоящего документа означает, в последовательности многократных введений, дозу антигенсвязывающей

молекулы, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00211] Способы согласно данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела к CD28 или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, специфично связывающей PSMA и CD28). Например, в отдельных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в отдельных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00212] В вариантах осуществления, включающих введение многократных вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом в вариантах осуществления, включающих введение многократных третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы частота, с которой субъекту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьировать в течение курса лечения. Частота введения может также корректироваться лечащим врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

#### Диагностические применения антител

[00213] Биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению также могут применяться для обнаружения и/или измерения CD28 или PSMA, или CD28-экспрессирующих, или PSMA-экспрессирующих клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело к CD28 x PSMA или его фрагмент могут применяться для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося нарушенной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.) CD28 или PSMA. Иллюстративные диагностические анализы на CD28 или PSMA могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом согласно изобретению, где указанное антитело мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы, немеченое антитело может применяться в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено пригодным для определения образом. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеина изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные примеры анализов, которые могут быть использованы для обнаружения или измерения CD28 или PSMA в

образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и флуоресцентно-активированную сортировку клеток (FACS). Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах на CD28 или PSMA согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, который может быть получен от пациента, содержащий поддающиеся обнаружению количества белка CD28 или PSMA или его фрагментов в норме или при патологии. Как правило, будут измерены уровни CD28 или PSMA в определенном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью CD28 или PSMA), для первоначального установления исходного или стандартного уровня CD28 или PSMA. Затем этот исходный уровень CD28 или PSMA можно сравнить с уровнями CD28 или PSMA, измеренными в образцах, полученных от лиц с подозрением на наличие заболевания или состояния, связанного с CD28 или PSMA.

#### ПРИМЕРЫ

[00214] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции согласно изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температур и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

#### *Аннотация*

[00215] Недавний клинический успех биспецифичных антител к опухолеспецифичному антигену (TSA) или опухолеассоциированному антигену (TAA)-CD3, таких как биспецифичные антитела к PSMAxCD3, меняет иммунотерапию рака. Антитела к TAA-CD3 обеспечивают относительно безопасные и доступные терапевтические решения, которые могут оказаться важным новым классом иммунотерапии. Однако они могут не достичь эффективности, наблюдаемой при использовании подходов с CAR-T-клетками, которые задействуют второй костимулирующий сигнал, часто опосредованный внутриклеточным доменом CD28. Действительно, антитела, активирующие CD28, невероятно эффективны, но также токсичны в исследованиях на людях. Термины TSA и TAA могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

[00216] В настоящем документе описан новый класс биспецифичных антител, называемых TAA-CD28, которые представляются безопасными, хорошо переносятся сами по себе и в комбинации с TAA-CD3, для создания значительно усиленных и в высокой степени нацеленных противоопухолевых ответов. С помощью TAA, таких как PSMA,

экспрессируемых на опухоли предстательной железы, было обнаружено, что ТААхCD28 повышало активацию Т-клеток и значительно усиливало лизис опухолевых клеток в присутствии опухолевой мишени и стимула TCR/CD3.

[00217] Было продемонстрировано, что биспецифичные антитела к ТААхCD28 согласно изобретению значительно повышали противоопухолевый иммунитет, опосредованный активацией Т-клеток, индуцированной ТААхCD3, в моделях сингенных опухолей. Спаривание CD3 с опухолевым антигеном с ограниченной экспрессией в здоровой ткани практически не индуцировало продукцию периферических цитокинов при применении по отдельности или в комбинации с ТААхCD28 в моделях на нечеловекообразных приматах и гуманизированных мышах. Кроме того, ТААхCD28 по отдельности практически не индуцировало секрецию сывороточных цитокинов и активацию Т-клеток у яванских макаков по сравнению с антителом-суперагонистом к CD28. Эти результаты дают основания полагать, что объединение этого нового класса костимулирующих биспецифичных антител с развивающимся классом ТАА-CD3 может обеспечить более безопасные, готовые к использованию биологические решения, которые могут заметно повысить эффективность традиционных биспецификов ТАА-CD3.

#### *Введение*

[00218] Хотя в течение последних двух десятилетий моноклональные антитела были признаны в качестве противоопухолевых терапевтических средств, они обладают ограниченной способностью мобилизовать Т-клетки и эффективно применять их цитотоксическую активность в месте опухоли. Ранее была продемонстрирована способность биспецифичных антител к направленной на Т-клетки иммунотерапии и последующему уничтожению опухолевых клеток. Действительно, платформа на основе биспецифичных антител направлена на рекрутирование иммунных эффекторных клеток путем объединения антитела к CD3 со связывающим доменом к опухолевой мишени. Недавно катумаксомаб (ЕрСАМхCD3) и блинатумомаб (CD19хCD3) получили одобрение надзорных органов для лечения острого лимфобластного лейкоза, в то время как многие другие биспецифичные антитела проходят исследования. Так, были сконструированы биспецифичные антитела, распознающие как В-клеточный маркер CD20, так и компонент CD3 репертуара Т-клеток, и в настоящее время они проходят клинические исследования для лечения гемобластозов. Так, ТАА-CD3 обеспечивают относительно безопасные и готовые к использованию терапевтические решения, которые не требуют тщательной и кропотливой адаптации для отдельного пациента. Однако, хотя биспецифики ТАА-CD3 могут оказаться важным новым классом иммунотерапии, перекрестные сравнения между исследованиями дают основания полагать, что они могут не достигнуть эффективности, наблюдаемой для подходов с применением CAR-T.

[00219] Два препарата на основе Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-T-клеток), Кумриiah и Yescarta, недавно получили одобрение FDA для лечения В-клеточных гемобластозов, что свидетельствует о большом потенциале этого подхода в области персонализированной иммунотерапии рака. В обоих продуктах используется

антиген CD19 в качестве опухолеассоциированного антигена (ТАА), который является идеальной мишенью для опосредованного Т-клетками уничтожения из-за его ограниченной экспрессии в В-клетках, что минимизирует нецелевую токсичность и повышает противоопухолевую эффективность. Однако высокая эффективность CAR-T-клеток была связана с побочными действиями, такими как синдром высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичность. Кроме того, лечение пока не приносит пользы всем пациентам, а количество переменных, которые могут повлиять на клинический результат для каждого пациента, относительно велико как при аутологическом, так и при аллогенном подходах. Кроме того, попытки нацеливания на опухолеассоциированные антигены в солидных опухолях пока не дали больших результатов, демонстрируя либо минимальную противоопухолевую активность, либо серьезные побочные действия. Ингибирующее микроокружение опухоли, плохой доступ CAR-T-клеток ко всей опухолевой ткани вместе с трудоемкостью производства представляют собой некоторые из текущих проблем для многообещающей CAR-T-клеточной терапии.

[00220] Одним из ограничений существующих иммунотерапевтических видов лечения является оптимальная индукция собственного иммунного ответа пациента против опухолевых клеток посредством специфичного распознавания опухолевых клеток и индукции цитотоксичности. Эффективная активация наивных Т-клеток и индукция «обученных» антигеном популяций Т-клеток памяти требует костимулирующих сигналов (сигнал 2) в дополнение к антигенспецифичному стимулу посредством комплекса TCR/CD3 (сигнал 1). Агонизм костимулирующих сигнальных путей CD28 и 4-1BB может обеспечить значительное усиление лизиса клеток-мишеней, что может оказать положительное действие на резистентность пациентов к различным видам иммунотерапии. Однако более широкая роль костимуляции в клинической онкологии еще недостаточно оценена. Многие опухоли лишены костимулирующих рецепторов, что не позволяет им дополнительно усиливать индуцированную CD3xТАА активацию Т-клеток.

[00221] Слепой скрининг костимулирующих сигнальных путей, проведенный в настоящем документе путем принудительной экспрессии костимулирующих лигандов на панели сингенных опухолей, показал, что CD28 является одним из наиболее мощных костимулирующих рецепторов вместе с 4-1BB. Кроме того, в настоящем документе были сконструированы биспецифичные антитела на костимулирующей основе, соединяющие CD28 на поверхности Т-клеток с ТАА из тканей предстательной железы для усиления противоопухолевого ответа. В настоящем документе представлены данные, демонстрирующие, что комбинированная терапия биспецификами ТАА-CD3 и ТАА-CD28 эффективно усиливала активацию Т-клеток и цитотоксичность в условиях одновременной стимуляции ТАА и TCR, что приводило к усилению противоопухолевого иммунитета. Действительно, данные, раскрытые в настоящем документе, дают основания полагать, что комбинирование этого нового класса биспецификов (ТАА-CD28) с развивающимся классом ТАА-CD3 может обеспечить более безопасные, готовые к использованию биологические решения, эффективность которых может приближаться к эффективности

индивидуализированной CAR-T-клеточной терапии.

[00222] Более конкретно, были созданы иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28, и было продемонстрировано, что иллюстративное антитело к PSMAxCD28 усиливает индуцированную PSMAxCD3 или CD20xCD3 активацию Т-клеток *in vitro* и безопасно повышает противоопухолевую эффективность *in vivo*. Активность *in vitro* была продемонстрирована путем демонстрации изображений биспецифичных антител, локализованных в иммунологическом синапсе конъюгата Т-клетки и клетки-мишени, усиления пролиферации, индуцированной PSMAxCD3, высвобождения цитокинов и цитотоксичности. Противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивали на моделях опухолей у мышей (сингенных). Контролировали динамику объема опухоли и сывороточных уровней цитокинов, чтобы продемонстрировать ответ на лечение биспецифичными антителами. Было проведено исследование на яванских макаках для определения безопасности и переносимости иллюстративного PSMAxCD28 согласно изобретению у нечеловекообразного примата. Животных исследовали на токсичность путем клинических наблюдений и сбора образцов крови для анализа сывороточных уровней цитокинов и фенотипа Т-клеток.

[00223] Как подробно описано ниже, иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 были созданы для усиления TCR/CD3-зависимой активации Т-клеток, тем самым имитируя костимуляцию (сигнал 2), обеспечиваемую профессиональными АПК.

[00224] Все процедуры проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных NIH (Национальных институтов здравоохранения). Протоколы были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Regeneron Pharmaceuticals.

#### Пример 1. Конструирование антител к PSMAxCD28

##### Получение антител к CD28

[00225] Антитела к CD28 были получены путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т. е. генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) белком CD28 человека, слитым с Fc-частью мышинового IgG2a, или клетками, экспрессирующими CD28, или ДНК, кодирующей CD28. Иммунный ответ антитела отслеживали с помощью иммуноанализа, специфичного в отношении CD28. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками мышинной миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать линии клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, продуцирующих специфичные к CD28 антитела. С помощью этого метода было получено несколько химерных антител к CD28 (т. е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и мышинными константными доменами). Кроме того, несколько полностью антител человека к CD28 были выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в заявке US 2007/0280945A1.

[00226] Некоторые биологические свойства иллюстративных антител к CD28, полученных в соответствии со способами, использованными в данном примере, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

#### **Получение антител к PSMA**

[00227] Антитела к PSMA получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши антигеном PSMA человека или путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, антигеном PSMA человека. В альтернативном варианте мышей иммунизировали клетками рака предстательной железы человека (LNCaP, ATTC, Манассас, Виргиния, США), экспрессирующими PSMA человека (№ UniProtKB/Swiss-Prot. Q04609). Иммунный ответ антитела отслеживали с помощью иммуноанализа, специфичного в отношении PSMA. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленциты собирали у каждой мыши и либо (1) сливали с клетками мышинной миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать линии клеток гибридомы, и подвергали скринингу на специфичность к PSMA, либо (2) сортировали В-клетки (как описано в заявке US 2007/0280945A1) с использованием PSMA человека с N-концевой 6-His-меткой (R&D, кат. № 4234-ZN) в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки). Первоначально были выделены химерные антитела к PSMA, имеющие человеческую вариabельную область и мышиную константную область. Были определены характеристики антител и осуществлен их отбор по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. При необходимости мышинные константные области заменяли желаемой человеческой константной областью, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, для создания полностью антитела человека к PSMA.

#### **Получение биспецифичных антител, связывающих CD28 и PSMA**

[00228] Биспецифичные антитела, содержащие специфичный к PSMA связывающий домен и специфичный к CD28 связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методик, где каждый из антигенсвязывающего домена к PSMA и антигенсвязывающего домена к CD28 содержит разные, отдельные HCVR в паре с общей LCVR. В некоторых случаях биспецифичные антитела были сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела к CD28, тяжелой цепи из антитела к PSMA и общей легкой цепи (см. таблицу 1). В отдельных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи из антитела к CD28 для иллюстративного биспецифичного антитела (bs16429D) представлена в SEQ ID NO: 81. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи из антитела к PSMA для иллюстративного биспецифичного антитела (bs16429D) представлена в SEQ ID NO: 82. Аминокислотная последовательность общей легкой цепи для bs16429D представлена в SEQ ID NO: 83.

[00229] Биспецифичные антитела, созданные в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т. е. связывающие плечи). Первый

антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из антитела к CD28 («CD28-VH»), а второй антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из антитела к PSMA («PSMA-VH»). Как анти-PSMA, так и анти-CD28 имеют общую легкую цепь. Спаривание CD28-VH/PSMA-VH создает антигенсвязывающие домены, которые специфично распознают CD28 на Т-клетках и PSMA на опухолевых клетках.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей

[00230] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR различных биспецифических антител, созданных в соответствии с примером 1. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 2.

**Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей**

Идентификатор продукта биспецифичного антитела анти-PSMA x анти- CD28	Второй антигенсвязывающий домен (D2, анти-PSMA)				Первый антигенсвязывающий домен (D1, анти-CD28)				Варибельная область легкой цепи			
	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D2- HCDR3	D3- LCV R	D3- LCDR 1	D3- LCDR 2	D3- LCDR 3
bs16429D	mAb11838P2				mAb14226P2				8567			
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
bs16430D	mAb11810P2				mAb14193P2				10082			
	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48
bs16431D	mAb11810P2				mAb14216P2				10082			
	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72

**Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот**

Идентификатор продукта биспецифичного антитела анти-PSMA x анти- CD28	Второй антигенсвязывающий домен (D2, анти-PSMA)				Первый антигенсвязывающий домен (D1, анти-CD28)				Варибельная область легкой цепи			
	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D2- HCDR3	D3- LCV R	D3- LCDR 1	D3- LCDR 2	D3- LCDR 3
bs16429D	mAb11838P2				mAb14226P2				8567			
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
bs16430D	mAb11810P2				mAb14193P2				10082			

	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43	45	47
bs16431D	mAb11810P2				mAb14216P2				10082			
	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71

Пример 3. CD28 и 4-1BB являются мощными костимулирующими рецепторами

[00231] Для определения того, какие костимулирующие рецепторы являются эффективными в обеспечении костимулирующего сигнала, важного для активации Т-клеток, был проведен слепой скрининг костимулирующих сигнальных путей путем принудительной экспрессии костимулирующих лигандов на панели сингенных опухолей (таблица 3 и **фиг. 2**), в котором вновь было установлено, что CD28 наряду с 4-1BB является одним из наиболее мощных костимулирующих рецепторов. В таблице 3 обобщенно представлено количество мышей без опухолей в слепом скрининге. В каждой группе тестировали по пять (5) мышей. Анализы проводили на трех (3) различных линиях опухолевых клеток, которые были генетически модифицированы для экспрессии семи (7) различных костимулирующих лигандов. Вкратце, опухолевые клетки EL4, MC38 и B16F10.9 были генетически модифицированы для экспрессии индивидуальных костимулирующих лигандов с помощью лентивирусной трансдукции. Клетки подкожно имплантировали мышам C57BL6 WT. Рост опухоли измеряли на 18, 24 и 25 день после имплантации опухолей типов EL4, MC38 и B16F10.9, соответственно. Это было временной точкой, когда объем опухолей из контрольных групп достиг максимально допустимого размера ( $>2000 \text{ мм}^3$ ). Были измерены размеры опухолей. В согласии с данными в таблице 3, CD28 и 4-1BB также являются одними из наиболее эффективных в уменьшении размера опухолей (данные не показаны).

**Таблица 3. Ингибирование роста опухоли в генетически модифицированных линиях клеток с введенной экспрессией костимулирующего лиганда**

Костимулирующий Лиганд	Костимулирующий Рецептор	Лимфома (EL4)	Карцинома (MC38)	Меланома (B16F10.9)
4-1BBL	4-BB	3	4	1
CD80 (B7.1)	CD28	2	2	2
CD86 (B7.2)	CD28	1	0	2
CD70	CD27	5	0	
OX40L	OX40	0	0	2
CD40	CD40L	0	1	0
ICOSL	ICOS	0	0	0
Пустой вектор		0	0	0
Родительские		0	0	

Пример 4. Аффинности связывания и кинетические константы биспецифичных антител к PSMAxCD28, полученные из анализа методом поверхностного плазмонного резонанса

[00232] Для определения кинетики связывания биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 определяли аффинности связывания и кинетические константы биспецифичных антител к PSMAxCD28 и соответствующих родительских

моноклональных антител к PSMA и/или CD28 в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса.

Кинетика связывания биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 с PSMA

[00233] Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания 6h.hPSMA (рекомбинантный белок PSMA/FOLH1 человека, R&D, кат. № 4234-ZN) с очищенным биспецифичным моноклональным антителом к PSMAxCD28 или двухвалентным родительским моноклональным антителом к PSMA определяли с использованием биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T-200. Поверхность сенсора CM5 Biacore модифицировали путем связывания по аминогруппе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека для захвата очищенных биспецифичных антител к PSMAxCD28 или родительских моноклональных антител к PSMA и к CD28.

[00234] Это исследование связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,05 об.% сурфактанта P20 (подвижный буфер HBS-P++). Различные концентрации hPSMA с N-концевой полигистидиновой меткой (6h.hPSMA, R&D) были приготовлены в подвижном буфере HBS-P++ в диапазоне от 10 нМ до 0,4 нМ с последовательными 3-кратными разведениями для биспецифичных антител к PSMAxCD28 и родительских моноклональных антител к PSMA или к CD28.

[00235] Различные концентрации 6h.hPSMA пропускали над поверхностью с захваченными моноклональными антителами со скоростью потока 50 мкл/мин. Ассоциацию 6h.hPSMA с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 3 минут, а диссоциацию 6h.hPSMA в подвижном буфере HBS-P++ отслеживали в течение 10 минут. Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0c (BioLogic Software). Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и диссоциативные периоды полужизни ( $t^{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости по формуле:  $K_D$  (М) =  $k_d/k_a$ , и  $t^{1/2}$  (мин) =  $0,693/k_d/60$

[00236] Кинетические параметры связывания для связывания 6h.hPSMA с очищенными моноклональными антителами при 25°C представлены ниже в таблице 4.

**Таблица 4. Аффинности связывания моноклональных антител с PSMA при 25°C в Biacore**

Идентификатор антитела	Обычное название	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$T^{1/2}$ (мин)
bs16429D	моноклональное антитело к	1,96E+05	4,92E-05	2,51E-10	234,6

	PSMAxCD28				
bs16430D	моноклональное антитело к PSMAxCD28	TBD	TBD	TBD	TBD
bs16431D	моноклональное антитело к PSMAxCD28	2,80E+05	3,85E-05	1,37E- 10	300,4
mAb11810P2	моноклональное антитело к PSMA	4,45E+05	2,99E-05	6,72E- 11	386,3
mAb11838P2	моноклональное антитело к PSMA	TBD	TBD	TBD	TBD
mAb14226P2	моноклональное антитело к CD28	NB	NB	NB	NB
mAb14193P2	моноклональное антитело к CD28	NB	NB	NB	NB
mAb14216P2	моноклональное антитело к CD28	NB	NB	NB	NB

TBD: не тестировалось

NB: связывания не наблюдалось

[00237] Кинетические параметры связывания 6h.hPSMA с одним очищенным иллюстративным моноклональным биспецифичным антителом при 37°C представлены ниже в таблице 5. Одна (1) RU (единица ответа) представляет собой 1 пг белка на мм<sup>2</sup>, как определено производителем.

**Таблица 5. Аффинности связывания моноклонального антитела с PSMA при 37°C в Viacore**

Идентифика тор антитела	Захват mAb (RU)	Связывание 10 нМ hPSMA.6H (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub>
bs16429D	256,8±0,9	43,5	2,00E+05	7,93E-05	3,96E-10	145,7
Идентифика тор антитела	Захват mAb (RU)	Связывание 20 нМ hPSMA.6H (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub>
bs16429D	189,7±1,6	73,7	2,93E+05	6,36E+05	2,17E-10	181,6

Кинетика связывания биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 с

## CD28

[00238] Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания hCD28.mmh с очищенными моноклональными антителами определяли с использованием биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T-200. Поверхность сенсора CM5 Biacore модифицировали путем связывания по аминогруппе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека для захвата очищенных биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 и родительских моноклональных антител к PSMA или к CD28.

[00239] Различные концентрации hCD28.mmh пропускали над поверхностью с захваченными моноклональными антителами со скоростью потока 50 мкл/мин. Ассоциацию hCD28.mmh с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 5 минут, а диссоциацию hCD28.mmh в подвижном буфере HBS-P++ отслеживали в течение 10 минут. Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и диссоциативные периоды полужизни ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости по формуле:  $K_D$  (M) =  $k_d/k_a$ , и  $t_{1/2}$  (мин) =  $0,693/k_d/60$

[00240] Кинетические параметры связывания для связывания hCD28.mmh с очищенным биспецифичным моноклональным антителом к PSMAxCD28 или двухвалентным родительским моноклональным антителом к CD28 при 25°C представлены ниже в таблице 6.

**Таблица 6. Аффинности связывания моноклональных антител с CD28 при 25°C в Biacore**

Идентификатор антитела	Обычное название	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	$T_{1/2}$ (мин)
bs16429D	моноклональное антитело к PSMAxCD28	2,26E+04	3,26E-03	1,44E-07	3,5
bs16430D	моноклональное антитело к PSMAxCD28	TBD	TBD	TBD	TBD
bs16431D	моноклональное антитело к PSMAxCD28	6,79E+03	1,41E-03	2,07E-07	8,2
mAB11810P2	моноклональное антитело к PSMA	NB	NB	NB	NB
mAB11838P2	моноклональное антитело к PSMA	TBD	TBD	TBD	TBD
mAB14226P2	моноклональное	2,34E+04	3,28E-	1,40E-07	3,5

	антитело к CD28		03		
mAB14193P2	моноклональное антитело к CD28	8,73E+03	2,64E- 04	3,03E-08	43,7
mAB14216P2	моноклональное антитело к CD28	1,12E+04	1,41E- 03	1,27E-07	8,2

TBD: не тестировалось

NB: связывания не наблюдалось

[00241] Кинетические параметры связывания для связывания hCD28.mmh с очищенным биспецифичным моноклональным антителом к PSMAxCD28 при 37°C представлены ниже в таблице 7.

**Таблица 7. Аффинности связывания моноклональных антител с CD28 при 37 °C**

Идентификатор антитела	Захват mAb (RU)	Связывание 400 нМ hCD28.6H (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	Kb (M)	t½
bs16429D	1576,3±5,0	98,9	2,46E+04	6,70E-03	2,72E-07	1,7

[00242] Как показано в таблицах 4-7, несколько антител к CD28 согласно настоящему изобретению связывают CD28 с высокой аффинностью. Несколько антител к PSMA согласно настоящему изобретению связывают PSMA с высокой аффинностью. Несколько биспецифичных антител к PSMAxCD28 связывают как CD28, так и PSMA с высокой аффинностью.

Пример 5. Эффективность и специфичность связывания биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 с PSMA и CD28 на клеточной поверхности

[00243] Чтобы оценить способность этих антител (моноклональных антител к PSMA, к CD28 и к PSMAxCD28) специфично связываться с белками клеточной поверхности, были разработаны анализы связывания *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих PSMA человека или CD28 с помощью платформы для определения на основе электрохемилюминесценции (MSD). Было проведено два исследования. В одном исследовании оценивали эффективность и специфичность связывания моноклональных антител с антигенами клеточной поверхности. Эти антитела (антитела к PSMA, к CD28 и к PSMAxCD28) демонстрировали специфичное связывание с линиями клеток, экспрессирующими PSMA человека или CD28 человека. В дополнительном эксперименте было проведено расширяющее исследование с изотипом антител IgG4s.

**Методы, использованные для определения эффективности и специфичности клеточного связывания биспецифичных антител к PSMAxCD28 с PSMA и CD28**

[00244] Линия клеток эпителиальной карциномы предстательной железы человека, C4-2 (UroCor), эндогенно экспрессирует PSMA человека. Линия клеток, экспрессирующая

HEK293/hCD28, была генетически модифицирована путем трансдукции эмбриональных клеток почки человека из ATCC (CRL-1573) устойчивой к неомицину лентивирусной конструкцией, кодирующей CD28 человека (hCD28, регистрационный номер NP\_006130.1). Для оценки специфичности связывания эти две линии клеток оценивали параллельно с родительской линией клеток HEK293HZ (которая является отрицательной в отношении PSMA и CD28) с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Антитело человека IgG1 к Feld1 было включено в качестве отрицательного контроля для обнаружения IgG.

[00245] Описанные выше линии клеток однократно промывали буфером 1xPBS без  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Irvine Scientific, кат. № 9240) и инкубировали в течение 10 минут при 37°C с раствором для диссоциации клеток, не содержащим ферментов (Millipore, кат. № S-004-C) для отделения клеток от колбы. Проводили дополнительную промывку 1xPBS с  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Irvine Scientific, кат. № 9236). Затем клетки подсчитывали с помощью счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, модель № Auto T4). Приблизительно 10 000 клеток на лунку в буфере для промывки клеток высевали по отдельности в 96-луночные планшеты с пластинчатыми угольными электродами (планшет с высоким связыванием MULTI-ARRAY, MSD, Meso Scale Discovery, кат. № L15XB-3/LX11XB-3) и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C, чтобы дать клеткам прикрепиться. Сайты неспецифического связывания блокировали 2% BSA (мас./об.) (Sigma, кат. № A8577-1L) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре.

[00246] Растворы, содержащие антитела к PSMA, к CD28, к PSMAxCD28 или контрольные антитела в последовательных разведениях от 1,7 пМ до 100 нМ или растворы без антитела добавляли к связанным с планшетом клеткам и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Если не указано иное, анализы проводили в двух повторах. Затем планшеты промывали для удаления несвязанных антител с использованием устройства для промывки планшетов AquaMax2000 с головкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies, модель № 2000). Связанные с планшетом антитела определяли с помощью конъюгированного с SULFO-TAG™ козьего поликлонального антитела к IgG человека, специфичного к тяжелой и легкой цепям (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-088) в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывок планшеты проявляли с помощью буфера для считывания (MSD, Meso Scale Discovery, кат. № R92TD-2) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем, и регистрировали люминесцентные сигналы с помощью прибора SECTOR Imager 600 (Meso Scale Discovery, модель № 600).

[00247] Сигналы от прямого связывания (в относительных световых единицах, RLU) анализировали как функцию концентрации антитела. Данные аппроксимировали сигмоидальной (четырепараметрической логистической) моделью доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ (программное обеспечение GraphPad версии № 6). Значения EC50, определяемые как концентрация антитела, при которой обнаруживается 50% от максимального сигнала связывания, определяли для

связывания с клетками HEK293/hCD28 и C4-2, чтобы обозначить силу связывания каждого антитела с CD28 или PSMA, соответственно. Кроме того, были рассчитаны отношения сигналов связывания антител при 11,1 нМ на клетках HEK293/hCD28 или C4-2 к клеткам HEK293HZ. Эта репрезентативная концентрация была выбрана ввиду высокого связывания с клетками-мишенями, но низкого фонового сигнала на CD28, PSMA-отрицательных клетках HEK293HZ. Антитела с отношением связывания менее 3 помечены как NB в приведенной ниже таблице 8. NB определено как «в условиях анализа специфического связывания не наблюдалось».

[00248] В дополнительном исследовании был проведен отдельный эксперимент с использованием того же протокола, что описан выше, но включая изотипический контроль IgG4 (см. USSN 15/147,791) и родительское моноклональное антитело к CD28. Тестируемые растворы содержали от 3,4 пМ до 200 нМ антител к PSMA, антител к CD28, биспецифичных моноклональных антител к PSMAxCD28 или контрольных антител в последовательных разведениях. Отношения связывания рассчитывали при 7,4 нМ.

*Результаты, краткие итоги и выводы*

[00249] Способность биспецифичных антител к PSMAxCD28 специфично связываться с клетками, экспрессирующими PSMA либо CD28, оценивали по сравнению с линией клеток, отрицательной в отношении экспрессии PSMA или CD28, с использованием анализа методом иммуносвязывания. Двухвалентные родительские антитела, специфичные к PSMA или CD28, были включены для сравнения. Дозозависимое связывание антитела с клетками на 96-луночных планшетах с высоким связыванием (MSD, Meso Scale Discovery, кат. № L15XB-3/LX11XB-3) с концентрациями антител до 100 нМ определяли с использованием конъюгированного с SULFO-TAG™ антитела к IgG человека, и сигналы связывания в электрохемилюминесценции регистрировали на Sector Imager 600 (MSD). Значения RLU определяли для связывания антител с клетками. Для клеток, экспрессирующих CD28 или PSMA, значения EC<sub>50</sub> рассчитывали как меру эффективности. Для образцов, которые привели к высокому фоновому сигналу, более высокие концентрации были исключены из расчета значений EC<sub>50</sub>, и значения отмечены звездочкой в таблице 8. Сравнение сигналов связывания антител при 11,1 нМ с клетками HEK293/hCD28 или C4-2 с отрицательными клетками HEK293HZ использовали для оценки специфичности связывания антител. Специфичное связывание определено как антитела, связывание которых с клетками, экспрессирующими CD28 или PSMA, в 3 или более раз выше, чем с клетками HEK293HZ при этой концентрации.

[00250] Результаты по связыванию обобщены в таблице 8. В концентрации 11,1 нМ три иллюстративных биспецифичных антитела к PSMAxCD28 согласно изобретению (bs16429D, bs16430D и bs16431D) специфично связывались как с клетками HEK293-hCD28, так и с клетками C4-2, с 13-31-кратным и 4-10-кратным отношением относительно клеток HEK293HZ, соответственно. Эффективность биспецифичных антител варьировала от значений EC<sub>50</sub> 5,31-9,58 нМ на клетках HEK293-hCD28 до 0,35-5,24 нМ на клетках C4-2.

**Таблица 8. Связывание моноклональных антител с антигенами клеточной**

**поверхности**

Идентификатор антитела	EC <sub>50</sub> (M) HEK293-hCD28	EC <sub>50</sub> (M) C4-2	HEK293-hCD28/HEK293HZ**	C4-2/HEK293HZ***
bs16429D	9,58E-09	8,53E-10	31	10
mAb14226P2 (CD28)	1,04E-09	NB	68	1
mAb11838P2 (PSMA)	NB	7,38E-10*	<1	4
bs16430D	8,47E-09	5,24E-09	41	10
mAb14193P2 (CD28)	1,02E-08	NB	110	1
mAb11810P2 (PSMA)#	NB	9,46E-10	1	25
bs16431D	5,31E-09	3,50E-10*	13	4
mAb14216P2 (CD28)	2,47E-09	NB	114	1
<i>КОНТРОЛЬ</i>				
Антитело к Feld#	NB	NB	1	1

NB: Неспецифичное связывание, о чем свидетельствует менее чем 3-кратное отношение сигнала связывания с клеткой к HEK293HZ при 11,1 нМ

\*: Концентрация выше 11,1 нМ исключена из расчета EC<sub>50</sub> из-за высокого фонового значения

#: Образцы обработаны как однократное последовательное разведение

\*\* : Отношение сигнала связывания 11,1 нМ антитела с клеткой (RLU) для HEK293-hCD28 относительно родительских HEK293HZ

\*\*\*: Отношение сигнала связывания 11,1 нМ антитела с клеткой (RLU) для C4-2 относительно HEK293HZ

[00251] Родительские антитела специфично связывались с клетками, соответствующими антигену, использованному для их создания, как указано в скобках в колонке с идентификатором антитела. Значения EC<sub>50</sub> для связывания с клетками HEK293-hCD28 и C4-2 для родительских антител варьировали от 1,04-10,2 нМ на клетках HEK293-hCD28 до 0,738-0,946 нМ на клетках C4-2. Для антител значения связывания mAb11838P2 и mAb11810P2 при более высоких концентрациях на клетках C4-2 были исключены из расчета значений EC<sub>50</sub>, чтобы компенсировать высокое фоновое значение на отрицательных клетках. Как и ожидалось, контрольное антитело IgG не показало специфичного связывания с линиями клеток, экспрессирующими CD28 или PSMA.

Дополнительный эксперимент был проведен, как описано выше, но включал изотипический контроль IgG4 и родительское моноклональное антитело к CD28. Эти данные были получены в качестве расширяющего исследования для демонстрации незначительного фонового сигнала с использованием изотипического контроля hIgG4s. Данные обобщенно представлены в **таблице 9**. Как показано в **таблице 9**, антитело к CD28 mAb14226P2 специфично связывается с клеткой, экспрессирующей CD28 человека,

HEK293-hCD28 P-3. Антитело к CD28 mAb14226P2 не связывается с клетками, которые не экспрессируют CD28 человека, вне зависимости от того, экспрессируют эти клетки PSMA (C4-2) или нет (HEK293HZ).

**Таблица 9. Связывание изотипа моноклональных антител с антигеном на клеточной поверхности**

Идентификатор антитела	EC <sub>50</sub> (M) HEK293-hCD28 P-3	EC <sub>50</sub> (M) C4-2 P-7	HEK293-hCD28/HEK293HZ*	C4-2/HEK293HZ**
mAb14226P2	8,41E-10	NB	99	1
КОНТРОЛЬ				
hIgG1к Feld1	NB	NB	1	1
hIgG4 к Feld1	NB	NB	1	1

NB: Неспецифичное связывание, о чем свидетельствует менее чем 3-кратное отношение сигнала связывания с клеткой к HEK293HZ при 11,1 нМ

\*: Отношение сигнала связывания 7,4 нМ антитела с клеткой (RLU) для HEK293-hCD28 относительно родительских HEK293HZ

\*\* : Отношение сигнала связывания 7,4 нМ антитела с клеткой (RLU) для C4-2 относительно HEK293HZ

Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с Т-клетками и клетками-мишенями

#### *Методика эксперимента*

[00252] Для определения связывания биспецифичных антител к PSMAxCD28 с C4-2, 22RV1, RAJI, Т-клетками человека и яванского макака использовали анализ методом проточной цитометрии с последующим определением меченым фикоэритрином (PE) антителом к IgG человека. Вкратце,  $1 \times 10^5$  клеток/лунку инкубировали в течение 30 минут при 4°C с последовательными разведениями биспецифичных антител к PSMAxCD28 или антитела человека IgG4 (см. USSN 15/147,791), которое связывает антиген человека без перекрестной реактивности с CD28 человека или яванского макака, в диапазоне от 133 нМ до 8,14 пМ для Т-клеток человека и яванского макака и в диапазоне от 133 нМ до 61 пМ для клеток, экспрессирующих PSMA. После инкубации клетки дважды промывали холодным PBS, содержащим 1% фильтрованного FBS, и добавляли к клеткам конъюгированное с PE вторичное антиантитело человека (Jackson Immunoresearch, кат. № 709-116-149) и инкубировали в течение еще 30 минут. К инкубируемым Т-клеткам человека и яванского макака добавляли краситель для определения жизнеспособности клеток. Лунки, не содержащие антител или содержащие только вторичные антитела, использовали в качестве контролей.

[00253] После инкубации с клетками, экспрессирующими PSMA, клетки промывали, повторно суспендировали в 200 мкл холодного PBS, содержащего 1% фильтрованный FBS, и анализировали методом проточной цитометрии на BD FACS Canto II.

[00254] После инкубации с Т-клетками человека или яванского макака клетки промывали и окрашивали смесью антител к CD2 (BD, кат. № 562638), к CD16 (BD, кат. №

562874), к CD4 (BD, кат. № 564305) и к CD8 (BD, кат. № 563795) в окрашивающем буфере Brilliant (BD, кат. № 566349), и продолжали инкубацию еще 20 минут при 4 °С. После промывки клетки повторно суспендировали в 200 мкл холодного PBS (Gibco, кат. № 14190-144), содержащего 1% фильтрованного FBS (TCB, кат. № 101), гейтировали по гейту живые/CD2+/CD4+/CD16- или живые/CD2+/CD8+/CD16- и анализировали методом проточной цитометрии на BD FACS LSR-Fortessa-X20.

*Результаты, краткие итоги и выводы:*

[00255] Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с поверхностью Т-клеток человека исследовали методом проточной цитометрии.

[00256] bs16429D связывалось со всеми Т-клетками со значением EC50  $4,80 \times 10^{-8}$  М. Оно связывалось как с CD4+, так и с CD8+ Т-клетками, со значениями EC50  $5,09 \times 10^{-8}$  М и  $5,89 \times 10^{-8}$  М, соответственно.

[00257] bs16431D слабо связывалось со всеми Т-клетками со значением EC50  $1,80 \times 10^{-7}$ . Оно слабо связывалось как с CD4+, так и с CD8+ Т-клетками, со значениями EC50  $1,67 \times 10^{-7}$  М и  $1,80 \times 10^{-7}$  М, соответственно.

[00258] Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с поверхностью линий клеток, экспрессирующих PSMA, исследовали методом проточной цитометрии.

[00259] C4-2 представляет собой линию клеток CaP (рак предстательной железы), полученную из клеток LNCaP (андроген-чувствительных клеток аденокарциномы предстательной железы человека, полученных из метастазов в лимфатические узлы; см. Wu et al., Int. J. Cancer, 57:406-412 (1994)). Как bs16429D, так и bs16431D связывалось с клетками C4-2 (см. Liu et al., 2004, Prostate, 60:98-108) со значениями EC50  $3,87 \times 10^{-9}$  М и  $1,50 \times 10^{-9}$  М, соответственно.

[00260] 22RV1 представляет собой линию клеток эпителиальной карциномы предстательной железы (см. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 1999, 35(7):403-409). Как bs16429D, так и bs16431D связывалось с клетками 22RV1 со значениями EC50  $3,05 \times 10^{-9}$  М и  $6,33 \times 10^{-9}$  М, соответственно.

[00261] Эти результаты обобщены в таблицах 10-12.

**Таблица 10. Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с Т-клетками человека**

Идентификатор антитела	CD2+ Т-клетки человека, FACS [M]	CD4+ Т-клетки человека, FACS [M]	CD8+ Т-клетки человека, FACS [M]
bs16429D	4,80E-08	5,09E-08	5,89E-08
bs16431D	(Слабое) 1,80E-07	(Слабое) 1,67E-07	(Слабое) 1,80E-07
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

**Таблица 11. Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с Т-клетками яванского макака**

Идентификатор антитела	CD2+ Т-клетки яванского макака, FACS [M]	CD4+ Т-клетки яванского макака, FACS [M]	CD8+ Т-клетки яванского макака, FACS [M]
bs16429D	1,10E-08	1,93E-08	(слабое) 6,84E-08
bs16431D	(слабое) 1,34E-07	(слабое) 2,81E-07	Очень слабое связывание
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

**Таблица 12. Связывание биспецифичных антител к PSMAxCD28 с клетками, экспрессирующими PSMA**

Идентификатор антитела	клетки C4-2, FACS [M]	клетки 22RV1, FACS [M]	клетки Raji, FACS [M]
bs16429D	3,87E-09	3,05E-09	Связывание отсутствует
bs16431D	1,50E-09	6,33E-09	Связывание отсутствует
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

Пример 6. Исходный и генетически модифицированный биоанализ на биспецифичные антитела к PSMAxCD28

[00262] Активация Т-клеток осуществляется путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR), которые распознают определенные пептиды, презентируемые белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (ГКГСИ или ГКГСII) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) (Goldrath *et al.*, Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire, Nature 402, 255-262 (1999)). Активированный TCR, в свою очередь, инициирует каскад сигнальных событий, которые можно отслеживать с помощью репортерных генов, управляемых различными факторами транскрипции, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор «каппа-би» (NFκB). Затем Т-клеточный ответ дополнительно уточняется путем задействования корецепторов, экспрессируемых или конститутивно, или индуцибельно на Т-клетках, таких как CD28, CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4), PD-1 (белок программируемой клеточной смерти 1), LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов) или другие молекулы (Sharpe *et al.*, The B7-CD28 Superfamily, Nat. Rev. Immunol., 2(2): 116-26 (2002)). Костимулирующая молекула CD28 активируется ее эндогенными лигандами CD80 или CD86, экспрессируемыми на АПК. CD28 усиливает клеточные сигналы, такие как сигнальные пути, контролируемые фактором транскрипции NFκB, после активации TCR. Сопутствующий сигнал CD28 важен для эффективной

активации Т-клеток, такой как дифференцировка, пролиферация, высвобождение цитокинов и уничтожение клеток Т-клетками (Smeets *et al.*, NFκB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-θ, PNAS, 97(7):3394-3399 (2012).

[00263] Чтобы идентифицировать антитела, которые усиливают активность Т-клеток при одновременном присутствии как первичной стимуляции, так и экспрессии мишени PSMA, антитела к CD28 и биспецифичные антитела к PSMAxCD28 были охарактеризованы с помощью генетически модифицированного репортерного биоанализа и клеточных анализов с использованием первичных Т-клеток человека. В анализах оценивается поведение биспецифичного антитела к PSMA/CD28 в условиях наличия и отсутствия первичной стимуляции, а также в условиях наличия и отсутствия экспрессии мишени. Схема анализов представлена на **фиг. 3**. Анализы проводили для отбора биспецифичных антител к PSMAxCD28, которые усиливают активность Т-клеток в условиях первичной стимуляции и экспрессии мишени. Соответственно, в анализах оценивали поведение биспецифичных антител в условиях наличия и отсутствия первичной стимуляции и экспрессии мишени.

1) Репортерный анализ на основе люциферазы:

*а) Генетическая модификация репортерных Т-клеток:*

[00264] Полученный из Jurkat Т-клеточный клон JRT3.T3.5 (ATCC, № TIB-153) трансдуцировали репортерной конструкцией с геном люциферазы NFκB (NFκB-Luc, SA Biosciences/Qiagen, кат. № CLS-013L). После выделения клона, устойчивого к пуромицину (JRT3.T3.5/NFκB-Luc клон 1C2), клетки дополнительно генетически модифицировали для экспрессии полноразмерной человеческой альфа-субъединицы TCR (1G4A - аминокислоты с M1 по S274) и бета-субъединицы TCR (1G4B - аминокислоты с M1 по G311) (Robbins *et al.*, Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions, J. Immunol. 180(9): 6116-31(2008)). После выделения единственного клона (J.RT3-T3.5/NFκB-Luc/1G4AB клон 1D2) клетки дополнительно генетически модифицировали для экспрессии полноразмерной человеческой альфа-субъединицы CD8 (hCD8a - аминокислоты с M1 по V235 под регистрационным № NP\_001139345) и человеческой бета-субъединицы CD8 (hCD8b - аминокислоты с M1 по K210 под регистрационным № P10966). Снова получали единственный клон (J.RT3-T3.5/NFκB-Luc/1G4AB/hCD8ab клон 1D5) и дополнительно трансдуцировали его полноразмерным CD28 человека (hCD28 - аминокислоты с M1 по S220, регистрационный № P10747). Клетки сортировали по высокой экспрессии CD28 и поддерживали в RPMI+20% FBS+пенициллин/стрептомицин/глутамин (P/S/G) + NEAA+NaPyr+1 мкг/мл пуромицина+500 мкг/мл G418+250 мкг/мл гигромицина+10 мкг/мл бластицидина. Для более быстрого роста генетически модифицированные репортерные Т-клетки содержали в среде для культивирования клеток без антибиотиков и использовали для клеточных экспериментов с люциферазой в качестве генетически модифицированных репортерных Т-клеток. Сведения о реагентах следующие: RPMI 1640, Irvine Scientific, кат. № 9160; FBS, Seradigm, кат. № 1500-50; пенициллин/стрептомицин/глутамин 100x (P/S/G), Thermo Fisher

Scientific, кат. № 10378-016; заменимые аминокислоты (NEAA), Irvine Scientific, кат. № 9304; пируват натрия (NaPyr), Millipore, кат. № TMS-005-C; пуромицин, Sigma, кат. № P8833; генетицин (G418), Thermo Fisher Scientific, кат. № 11811-098; гигромицин; бластицидин.

*b) Генетическая модификация АПК:*

[00265] Стабильную линию клеток HEK293 (ATCC, № CRL-1573), экспрессирующую CD20 человека (аминокислоты с M1 по P297 под регистрационным номером NP\_068769.2), трансдуцировали PSMA человека (аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609). PSMA-положительные клетки человека выделяли с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), и полученную линию клеток, отсортированную по HEK293/CD20/hPSMA выс, поддерживали в DMEM+10% + P/S/G+NEAA с добавкой 500 мкг/мл G418.

*c) Стимуляция Т-клеток/АПК:*

[00266] В этом эксперименте генетически модифицированные репортерные Т-клетки стимулируют двумя биспецифичными антителами. Первую стимуляцию осуществляют активирующим Т-клетки биспецифичным антителом, hIgG4 к CD3xCD20 (см. WO14/047231, US9657102 и USSN 14/661,334), нацеленным на молекулы CD3 на генетически модифицированных репортерных Т-клетках и CD20 на клетках HEK293. При этом первая стимуляция позволяет обойтись без активации TCR их естественными лигандами, которые представляют собой определенные пептиды, экспонируемые на молекулах ГКГС. Вторую стимуляцию вызывает биспецифичное антитело к CD28. Это антитело имитирует активацию CD28 на Т-клетках его лигандами, CD80/CD86, экспрессируемыми на АПК. При этом антитело взаимодействует с CD28 на Т-клетках и PSMA на генетически модифицированных клетках HEK293 и запускает активацию CD28 на генетически модифицированных репортерных Т-клетках. Одновременная активация TCR и CD28 приводит к усилению транскрипционной активности NFκB, что, в свою очередь, индуцирует продукцию репортерного гена, люциферазы.

*d) План люциферазного анализа:*

[00267] RPMI1640 с добавками 10% FBS и P/S/G использовали в качестве среды для анализа для получения клеточных суспензий и разведения антител для скрининга биспецифичных антител к PSMA x CD28.

[00268] За день до скрининга генетически модифицированные репортерные Т-клетки культивировали до плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среде для культивирования клеток. Трехкратно (1:3) последовательно разведенные биспецифичные антитела к PSMA x CD28 и контроли тестировали в присутствии постоянной концентрации 50 пМ антитела к CD20 x CD3 или изотипического контроля hIgG4. Диапазон 10-точечного разведения составлял от 15 пМ до 100 нМ, при этом конечное разведение не содержало антител к PSMA x CD28. Реагенты добавляли в следующем порядке: 1) последовательно разведенные антитела добавляли в 96-луночные белые планшеты с плоским дном в соответствующие лунки; 2) в каждую лунку добавляли фиксированную концентрацию 50 пМ антитела к CD20 x CD3 или

изотипического контроля hIgG4; 3) в планшеты добавляли АПК, повторно суспендированные до плотности  $4 \times 10^5$  клеток/мл, с конечной концентрацией  $1 \times 10^4$  клеток/лунку; 4) репортерные Т-клетки, культивированные в течение ночи, повторно суспендировали с плотностью  $2 \times 10^6$ /мл и добавляли в планшеты с конечной концентрацией  $5 \times 10^4$  клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4-6 часов при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  перед добавлением 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega, кат. № E6051) для лизирования клеток и определения люциферазной активности. Испускаемое излучение регистрировали в относительных световых единицах (RLU) на многоканальном планшетном анализаторе Envision (PerkinElmer, модель 2104). Все последовательные разведения были протестированы в двух повторах.

[00269] Значения  $\text{EC}_{50}$  антител определяли путем аппроксимации данных четырехпараметрическим логистическим уравнением на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Кратность индукции рассчитывали по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Средние значения RLU антитела [100 нМ]}}{\text{Средние значения RLU антитела [0 нМ]}}$$

2) Функциональный анализ IL-2 с использованием первичных  $\text{CD4}^+$ Т-клеток человека:

[00270] Был разработан функциональный анализ в первичных  $\text{CD4}^+$  Т-клетках/АПК для оценки влияния активации CD28 на продукцию IL-2 при связывании с биспецифичными антителами к PSMA x CD28.

*а) Выделение первичных  $\text{CD4}^+$  Т-клеток человека:*

[00271] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МНПК) выделяли из лейкоцитного концентрата, полученного от здорового донора. Выделение МНПК осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ на 50 мл (StemCell Technologies, кат. № 85450) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Вкратце, в пробирки SepMate на 50 мл наливали слой 15 мл FicollPaque PLUS с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1:2 с помощью D-PBS (натрий-фосфатный буфер Дульбекко, Irvine Scientific, кат. № 9240). Последующие стадии проводили в соответствии с протоколом производителя SepMate. Затем из МНПК выделяли  $\text{CD4}^+$  Т-клетки с использованием наборов микросфер к CD4 человека от Miltenyi Biotec (кат. № 130-045-101), следуя инструкциям производителя. Выделенные  $\text{CD4}^+$  Т-клетки замораживали в FBS, содержащем 10% ДМСО (Macron Fine Chemicals, кат. № 4948-02) в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток на флакон.

*б) Высвобождение IL-2 из первичных  $\text{CD4}^+$  Т-клеток, обработанных антителами к CD28:*

[00272] В этом анализе первичные  $\text{CD4}^+$  Т-клетки активируют посредством перекрестного связывания CD3 на их поверхности с использованием биспецифичного антитела к CD20 x CD3 в комбинации с клетками HEK293, генетически модифицированными для экспрессии CD20 человека. Связывание плеча к CD20

биспецифичных антител к CD20 x CD3 с клетками HEK293, экспрессирующими CD20, запускает кластеризацию рецептора CD3, обеспечивая первый сигнал, важный для стимуляции Т-клеток. Однако для определения количественного высвобождения IL-2 важна костимуляция, которая может быть обеспечена путем перекрестного связывания молекул CD28. При этом биспецифичные антитела к PSMA x CD28 взаимодействуют с CD28 на CD4<sup>+</sup> Т-клетках и PSMA на генетически модифицированных клетках HEK293/hCD20, и запускают кластеризацию - активацию CD28. Комбинированное задействование TCR и CD28 приводит к усилению продукции IL-2, который высвобождается в культуральную среду. IL-2 обнаруживают и количественно определяют в клеточном супернатанте с использованием гомогенного, без промывок, набора AlphaLisa (PerkinElmer, кат. № AL221).

[00273] Ранее выделенные и замороженные CD4<sup>+</sup> Т-клетки человека от донора размораживали в день проведения анализа в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 (Lonza, кат. № 04-418Q) с добавками 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA и 0,01 mM BME ( $\beta$ -меркаптоэтанол, Sigma-Aldrich, кат. № M-7522), содержащей 50 Ед/мл бензоназной нуклеазы (EMD Millipore, кат. № 71205-3)). Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, повторно суспендировали в стимулирующей среде и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/луночку. Клетки HEK293, генетически модифицированные для экспрессии CD20 человека, по отдельности или в комбинации с PSMA человека, обрабатывали 15 мкг/мл митомицина С (Sigma-Aldrich, кат. № M4287) в стимулирующей среде для первичного посева в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл. После инкубации в течение 1 часа при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, клетки HEK293 3 раза промывали D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли в лунки, содержащие CD4<sup>+</sup> Т-клетки, в конечной концентрации  $1 \times 10^4$  клеток на лунку.

[00274] Затем в лунки добавляли последовательно разведенные 1:3 биспецифичные антитела к PSMA x CD28 или контрольные антитела в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ в присутствии 50 пМ анти-CD20 x CD3 или изотипического контроля hIgG4. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала антител к PSMA x CD28 или к CD28. После инкубации планшетов в течение 72 часов при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, их центрифугировали для осаждения клеток и собирали 40 мкл супернатанта среды. Из этого объема 5 мкл тестировали в анализе IL-2 человека методом AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения делали на многоканальном планшетном анализаторе Envision (PerkinElmer, модель 2104). Градуировочную кривую известных концентраций IL-2 использовали для определения концентраций IL-2, генерированных в анализируемых лунках. Все последовательные разведения были протестированы в двух повторах.

[00275] Значения EC<sub>50</sub> антител определяли путем аппроксимации данных четырехпараметрическим логистическим уравнением на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Кратность индукции рассчитывали по следующему уравнению:

Кратность Средние значения IL-2 антитела [100 нМ]  
 индукции = Средние значения IL-2 антитела [0 нМ]

Результаты, краткие итоги и выводы

[00276] Как показано на **фиг. 4А** и **4В**, активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток (измеренная по высвобождению IL-2) и генетически модифицированных клеток JRT3.T3/ 1G4/hCD28 (измеренная по люциферазной активности) усиливалась антителами к hPSMA x hCD28 в условиях первичной стимуляции (REGN2281 к CD20xCD3) и PSMA, экспрессируемого на клетках HEK293/hCD20. Двухвалентное антитело к CD28, mAb14193P2, незначительно усиливает активность Т-клеток в присутствии первичной стимуляции и незначительно в генетически модифицированном биоанализе в условиях отсутствия первичной стимуляции. Суперагонист к CD28, TGN1412, усиливает активацию Т-клеток как в первичном, так и в генетически модифицированном анализе в условиях стимуляции CD20 x CD3, хотя и в меньшей степени, чем биспецифики PSMA x CD28, в условиях наличия мишени PSMA и первичной стимуляции.

1) *Репортерный анализ на основе люциферазы:*

[00277] Значения EC<sub>50</sub> и кратности индукции обобщены в таблицах 13 и 14 для генетически модифицированных репортерных Т-клеток, совместно инкубированных с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA в дополнение к постоянной концентрации 50 пМ изотипического контроля hIgG4 или биспецифичного антитела к CD3 x CD20 (биспецифичного антитела, стимулирующего Т-клетки).

**Таблица 13. Люциферазная активность в генетически модифицированных репортерных Т-клетках в отсутствие стимуляции TCR**

Антитела	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность индукции	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность индукции
bs16429D	-	0,81	-	1,04
bs16430D	-	0,87	-	0,89
bs16431D	-	0,94	-	0,98
mAb14226P2 (CD28)	5,11 E-09	4,76	4,90 E-09	3,59
mAb14193P2 (CD28)	-	0,86	-	0,89
mAb14216P2 (CD28)	n/c (не рассчитано )	2,80	n/c	3,95
Одно плечо mAb14226P2	-	0,83	-	0,88

Одно плечо mAb14193P2	-	0,88	-	0,86
Одно плечо mAb14216P2	-	0,89	-	0,91

В таблице 14 обобщены результаты значений  $EC_{50}$  и кратности индукции для люциферазной активности в генетически модифицированных Т-клетках, совместно инкубированных с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA и постоянной концентрацией 50 пМ изотипического контроля hIgG4.

**Таблица 14. Люциферазная активность в генетически модифицированных репортерных Т-клетках в условиях стимуляции TCR**

Антитела	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	$EC_{50}$ [M]	Кратность индукции	$EC_{50}$ [M]	Кратность индукции
bs16429D	-	1,00	1,72 E-10	16,15
bs16430D	-	0,92	4,57 E-10	13,61
bs16431D	-	0,95	2,78 E-10	24,47
mAb14226P2 (CD28)	3,59 E-09	3,16	3,27 E-09	3,03
mAb14193P2 (CD28)	2,23 E-08	1,27	-	1,37
mAb14216P2 (CD28)	n/c	3,26	n/c	3,15
Одно плечо mAb14226P2	-	0,99	-	0,95
Одно плечо mAb14193P2	2,24 E-08	1,10	-	1,15
Одно плечо mAb14216P2	-	0,96	-	0,94

В таблице 14 обобщены результаты значений  $EC_{50}$  и кратности индукции для люциферазной активности в генетически модифицированных Т-клетках, совместно инкубированных с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA и постоянной концентрацией 50 пМ анти-CD3хCD20.

[00278] При обработке Т-клеток и АПК 50 пМ изотипического контроля hIgG4 ни одно из биспецифичных антител к CD28 не показало увеличения люциферазной активности в отсутствие стимуляции TCR, независимо от линии АПК, использованной в анализе. Небольшая активация люциферазы наблюдалась с одним из родительских антител к CD28

(mAb14226P2) на клетках HEK293/hCD20 (4,76x) и клетках HEK293/hCD20/hPSMA (3,59x), как показано в таблице 14.

[00279] Напротив, при обработке клеток 50 пМ биспецифичного антитела к CD3 x CD20 все три биспецифичных антитела к PSMA x CD28, bs16429D, bs16430D и bs16431D, в высокой степени индуцировали люциферазную активность при совместной инкубации с АПК, экспрессирующими на своей поверхности hPSMA. Независимо от линии АПК практически не наблюдалось активации у контролей с одним плечом (одно плечо mAb14226P2, mAb14193P2 и mAb14216P2). Небольшая активация люциферазы наблюдалась для всех трех родительских антител к CD28 (mAb14226P2, mAb14193P2 и mAb14216P2), как показано в таблице 14.

2) *Функциональный анализ IL-2 с использованием первичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека:*

[00280] Способность биспецифичных антител к PSMA x CD28 обеспечивать костимуляцию посредством CD28 на Т-клетках в условиях отсутствия или наличия экспрессии мишени PSMA оценивали в функциональном анализе первичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, измеряя продукцию цитокинов IL-2.

[00281] Значения EC<sub>50</sub> и кратности индукции обобщены в таблице 15 для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, инкубированных совместно с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA в дополнение к постоянной концентрации 50 пМ изотипического контроля hIgG4 или биспецифичного антитела к CD3 x CD20 (биспецифичного антитела, стимулирующего Т-клетки).

[00282] Как и ожидалось, не наблюдалось какого-либо измеримого высвобождения IL-2 в лунках, содержащих постоянные количества изотипического контроля hIgG4, поскольку первичная стимуляция Т-клеток отсутствовала.

[00283] Напротив, измеримые уровни IL-2 были обнаружены в образцах, обработанных биспецифичным антителом к CD3 x CD20. В этих условиях при совместной инкубации CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека с клетками HEK293/hCD20 все протестированные моноклональные антитела к CD28, включая антитела к CD28 и биспецифичные антитела к PSMA x CD28, за исключением bs16430D и bs16431D, продемонстрировали повышенные уровни IL-2 (таблица 15). Родительское антитело mAb14226P2 продемонстрировало наивысшую кратность индукции и EC<sub>50</sub>, равную приблизительно 6 нМ. Высвобождение IL-2 было обнаружено для всех трех биспецифичных антител к PSMAxCD28 (bs16429D, bs16430D и bs16431D) при совместном культивировании CD4<sup>+</sup> Т-клеток с АПК, экспрессирующими hPSMA, и биспецифичным антителом к CD3 x CD20. Более низкие уровни IL-2 измерены для их контролей с одним плечом и родительских антител в тех же условиях, что и в таблице 15. **Таблица 15. Продукция IL-2 первичными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в условиях стимуляции TCR**

Антитела	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность

		индукции		индукции
bs16429D	n/c	22	0,27 E-09	606
bs16430D	-	1	0,15 E-09	165
bs16431D	-	1	0,22 E-09	463
mAb14226P2 (CD28)	6,05 E-09	110	8,69 E-09	46
mAb14193P2 (CD28)	n/c	27	n/c	13
mAb14216P2 (CD28)	n/c	13	n/c	11
Одно плечо mAb14226P2	n/c	21	n/c	14
Одно плечо mAb14193P2	13,78 E-09	21	14,52 E-09	13
Одно плечо mAb14216P2	n/c	9	n/c	6

В таблице 15 обобщены результаты значений  $EC_{50}$  и кратности индукции для продукции IL-2 первичными  $CD4^+$  Т-клетками, совместно инкубированными с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA и постоянной концентрацией 50 пМ антитела к CD3хCD20.

Пример 7. Биспецифичные антитела к PSMAхCD28 усиливают активацию Т-клеток при одновременном присутствии как PSMA, так и стимуляции TCR анти-CD20хCD3

[00284] Иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAхCD28 были получены и проверены анализом Biacore (см., например, примеры 1 и 4). Пару биспецифичных антител (CD20хCD3 и иллюстративных биспецифичных антител к PSMAхCD28 согласно изобретению) использовали для индукции кластеризации Т-клеток и костимулирующих рецепторов на опухолевых клетках путем связывания с PSMA (CD20 и простатоспецифичный мембранный опухолевый антиген - PSMA) (фиг. 5А). Чтобы продемонстрировать, что PSMAхCD28 связывает и активирует CD28 в присутствии PSMA, экспрессируемого на клетках-мишенях, и активации TCR, была проведена серия клеточных анализов *in vitro*.

#### Локализация CD28

##### *Линии клеток*

[00285] Стабильную линию клеток HEK293 (ATCC, № CRL-1573) использовали для создания линий клеток HEK293/hCD20, HEK293/hPSMA и HEK293/hCD20/hPSMA. Для создания линии клеток HEK293/hPSMA проводили стабильную трансфекцию с использованием вектора для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующего

управляемый промотором убиквитина-С PSMA (аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609) и ген устойчивости к неомицину. Аналогичным образом была создана линия клеток HEK293/hCD20 с использованием вектора для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующего управляемый промотором убиквитина hCD20 (аминокислоты с M1 по P297 под регистрационным номером NP\_068769.2). Трансфицированные клетки культивировали в 500 мкг/мл генетицина А для отбора стабильно экспрессирующих линий клеток.

[00286] Для получения клеток HEK293/hCD20/hPSMA использовали лентивирусную плазмиду, кодирующую PSMA человека (аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609) и ген устойчивости к неомицину, для трансфекции клеток HEK293T, способствуя продуцированию вирусных частиц, которые впоследствии были использованы для инфицирования клеток HEK293/hCD20. PSMA-положительные клетки человека выделяли с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Все полученные линии клеток поддерживали в DMEM+10% FBS+P/S/G+NEAA с добавкой 500 мкг/мл G418. Клон Jurkat E6-1 (ATCC, № TIB-152) культивировали в соответствии с рекомендованным протоколом ATCC.

[00287] Для получения клеток MC38/hPSMA использовали лентивирусную плазмиду, кодирующую PSMA человека (аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609) и ген устойчивости к неомицину, для трансфекции клеток HEK293T, способствуя продуцированию вирусных частиц, которые впоследствии были использованы для инфицирования родительских клеток MC38. PSMA-положительные клетки человека выделяли с помощью FACS. MC38/hPSMA поддерживали в DMEM+10% FBS+P/S/G+NEAA с добавкой 500 мкг/мл G418.

#### *Amnis Image stream*

[00288] Т-клетки Jurkat и клетки-мишени (HEK293/hPSMA или HEK293/hPSMA/hCD20) инкубировали с CD20xCD3-Alexa488 (REGN2280, 0,5 мкг/мл), отдельно или вместе с PSMAxCD28-Alexa647 (bs16429D, 1 мкг/мл), в течение 1 часа при 37 °С. Клетки дважды осторожно промывали буфером для FACS (3% FBS, 2 мМ ЭДТА в PBS) и окрашивали антителом к CD28 с биотином (REGN1412, 2 мкг/мл) в течение 15 минут при 4 °С, а затем стрептавидином-PE-CF594 (BD 562284, 1 мкг/мл) и Hoeschst 33342 (Thermo Fisher H3570, 1 мкМ) в течение 15 минут при 4 °С. Клетки промывали PBS и хранили в стабилизирующем фиксаторе BD (BD 338036). Изображения клеток получали на проточном цитометре с визуализацией Amnis® и анализировали с помощью программного обеспечения IDEAS®. Клетки гейтировали по светлопольному дуплету, дуплетному ядру, фокусу ядра, подсчету одиночных пятен, синглету CD28. Площадь синапсов определяли наложением маски Valley на основе окрашивания ядра. Клетки с неправильной маской Valley удаляли путем гейтирования по области перекрытия между маской Valley и CD28. Отношение CD28 в синапсе/вне синапса рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{CD28 в синапсе/вне синапса} = \frac{\text{интенсивность CD28 в синапсе}}{\text{общая интенсивность CD28} - \text{интенсивность CD28 в синапсе}} * 100\%.$$

*Результаты, краткие итоги и выводы*

[00289] Т-клетки культивировали совместно с генетически модифицированными клетками-мишенями (HEK293/hPSMA или HEK293/hCD20/hPSMA), сверхэкспрессирующими CD20 и PSMA, и флуоресцентно мечеными биспецификами (CD20хCD3 - зеленым, PSMAхCD28 - красным). Для определения локализации CD28 клетки фиксировали и окрашивали антителом к CD28 после инкубации в течение 1 часа при 37 °С. Изображения конъюгатов Т-клеток и клеток-мишеней были получены с использованием проточного цитометра с визуализацией Amnis ImageStream. В отсутствие экспрессии PSMA на клетках-мишенях биспецифик CD20хCD3 сам по себе практически не индуцировал кластеризацию CD28 на Т-клетках. При экспрессии PSMA на клетках-мишенях CD20хCD3 локализовался на границе раздела конъюгатов Т-клеток и клеток-мишеней и образовывал иммунологический синапс (ИС), где был локализован CD28. PSMAхCD28 вместе с CD20хCD3 дополнительно усиливали накопление CD28 в ИС. Распределение CD28 количественно оценивали путем расчета отношения окрашивания CD28 внутри ИС и за его пределами (**фиг. 5В**).

[00290] Был сделан вывод, что PSMAхCD28 в присутствии PSMAхCD3 и клеток-мишеней, экспрессирующих PSMA, вызывает устойчивое накопление CD28 в ИС - месте, где происходит передача сигналов для активации Т-клеток.

*Высвобождение цитокинов*

[00291] Для дальнейшего изучения влияния TAAхCD28 на активацию Т-клеток измеряли пролиферацию Т-клеток и высвобождение цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$  после инкубации с титрованными дозами биспецификов CD20хCD3 или PSMAхCD28 в совместном культивировании с первичными Т-клетками человека и генетически модифицированными клетками-мишенями, сверхэкспрессирующими различные TAA (HEK293/hPSMA, HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/hPSMA) (**фиг. 5С-5Г**). Было подтверждено, что иллюстративные антитела к PSMAхCD28 согласно изобретению и биспецифичные антитела к PSMAхCD3 не конкурируют за связывание с клетками, экспрессирующими PSMA, и, следовательно, связываются с разными эпитопами (**фиг. 5Н**). Кроме того, было подтверждено, что PSMAхCD28 индуцировало активацию Т-клеток в условиях одновременной стимуляции CD3 и экспрессии PSMA на клетке-мишени (HEK293/hCD20/hPSMA плюс 5 пМ CD20хCD3). Активация Т-клеток иллюстративными биспецифичными антителами к PSMAхCD28 не наблюдалась в отсутствие экспрессии PSMA на клетках-мишенях (совместное культивирование с HEK293/hCD20) или в отсутствие стимуляции CD3 (совместное культивирование с HEK293/PSMA плюс 5 пМ CD20хCD3 или HEK293/hCD20/hPSMA плюс 5 пМ изотипического контроля). (**Фиг. 5Е-5Г**). В целом было продемонстрировано, что иллюстративные антитела к PSMAхCD28 согласно изобретению стимулируют активацию Т-клеток в присутствии PSMAхCD3 и экспрессирующих PSMA клеток-мишеней, что приводит к повышенной пролиферации и секреции цитокинов.

Пример 8. Уничтожение клеток, экспрессирующих PSMA

[00292] Было проведено два исследования цитотоксичности на основе FACS. В первом исследовании исследовали цитотоксичность на основе FACS на клетках С4-2 в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) человека в условиях наличия или отсутствия стимуляции анти-PSMAxCD28. Стимуляцию проводили в присутствии фиксированной концентрации биспецифичного антитела к PSMAxCD28 и последовательных разведений биспецифичного антитела к PSMAxCD3. Второе исследование было идентично первому за исключением того, что вместо МНПК человека использовали МНПК яванского макака. Был сделан вывод, что биспецифичные антитела к PSMAxCD28 усиливают активацию Т-клеток и цитотоксичность в отношении опухолевых клеток предстательной железы в условиях стимуляции TCR посредством PSMAxCD3.

Методики проведения экспериментов

*Выделение первичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека*

[00293] Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) человека выделяли из лейкоцитного концентрата, полученного от здорового донора. Выделение МНПК осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ на 50 мл в соответствии с протоколом производителя. Затем из МНПК выделяли CD4<sup>+</sup> Т-клетки с использованием набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека EasySep™ от StemCell Technologies, следуя инструкциям, рекомендованным производителем. Выделенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки замораживали в FBS, содержащем 10% ДМСО, в концентрации  $50 \times 10^6$  клеток на флакон.

*Анализ активации первичных Т-клеток человека*

[00294] Ранее выделенные и замороженные CD4<sup>+</sup> Т-клетки человека размораживали в день проведения анализа в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавками 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA и 0,01 мкМ ВМЕ), содержащей 50 Ед/мл бензоназной нуклеазы. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, повторно суспендировали в стимулирующей среде и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток на лунку. Клетки HEK293 (HEK293/hPSMA, HEK293/hCD20 или HEK293/hPSMA/hCD20) обрабатывали 15 мкг/мл митомицина С в стимулирующей среде для первичного посева в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл. После инкубации в течение 1 часа при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, клетки HEK293 3 раза промывали D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли в лунки, содержащие CD4<sup>+</sup> Т-клетки в конечной концентрации  $2 \times 10^4$  клеток на лунку.

[00295] Для определения субоптимальной концентрации биспецифичного антитела к CD20xCD3 для активации Т-клеток, CD20xCD3 последовательно разводили 1:3 в диапазоне от 1,5 пМ до 10 нМ в присутствии 500 пМ биспецифика PSMAxCD28 или изотипического контроля hIgG4s. Была выбрана постоянная концентрация 5 мкМ биспецифика CD20xCD3 или контрольного hIgG4, и следующие антитела: 1) PSMA x CD28 2) контрольное ненацеленное x CD28 3) родительское CD28 4) CD28SA (суперагонист) 5) изотипический контроль hIgG4 и 6) изотипический контроль hIgG4s, титровали от 15 пМ до 100 нМ с разведением 1:3. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала

титруемых антител, только 5 пМ биспецифика CD20хCD3 или контрольного hIgG4.

[00296] После инкубации планшетов в течение 48 часов при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, их центрифугировали для осаждения клеток и собирали 50 мкл супернатанта среды. Из этого объема 5 мкл тестировали в анализе IL-2 человека и IFN $\gamma$  человека методом AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения делали на многоканальном планшетном анализаторе Envision от Perkin Elmer. Была построена градуировочная кривая известных концентраций IL-2 или IFN $\gamma$  для экстраполяции пг/мл IL-2 или IFN $\gamma$ , генерированных в анализируемых лунках. Все последовательные разведения были протестированы в двух повторах. Осажденные клетки инкубировали с [метил-3H]-тимидином, 0,25 мкКи/лунку в течение 16 часов при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали на планшеты Perkin Elmer Unifilter с использованием сборщика клеток Unifilter 96 Cell Harvester от Perkin Elmer. После добавления 30 мкл сцинтилляционной жидкости планшеты запечатывали и регистрировали число импульсов в минуту для каждой лунки, используя TopCount NXT от Perkin Elmer.

[00297] Значения EC<sub>50</sub> антител определяли из четырехпараметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™.

#### *Анализ цитотоксичности на основе FACS*

[00298] Чтобы отслеживать уничтожение PSMA<sup>+</sup> клеток в присутствии комбинации антител к PSMAхCD3 и к PSMAхCD28, клетки С4-2 метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Violet Cell Tracker (Invitrogen, кат. № 34557). После мечения клетки высевали на ночь при 37 °С. Отдельно МНПК человека (New York Blood Center (Нью-Йоркский центр крови)) или МНПК яванского макака (Covance, Кранфорд, Нью-Джерси) высевали в среду RPMI с добавками в концентрации 1×10<sup>6</sup> клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°С для обогащения лимфоцитами за счет обеднения адгезивными макрофагами, дендритными клетками и некоторыми моноцитами. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с обедненными адгезивными клетками наивными МНПК (соотношение эффектор/клетка-мишень составляло 4:1) и последовательными разведениями биспецифичного антитела к PSMAхCD3 или контроля IgG4 (диапазон концентраций: 0,42 нМ - 0,1 пМ), по отдельности или в комбинации с фиксированной концентрацией костимулирующих молекул к PSMAхCD28, bs16429D или bs16431D, при 2,5 мкг/мл (16,7 нМ) в течение 96 часов при 37 °С.

[00299] После инкубации клетки удаляли из планшетов для культивирования клеток с помощью буфера для диссоциации трипсин-ЭДТА (Millipore, кат. № SM-2004-C) и анализировали методом FACS на FACS BD LSRFortessa-X20 (BD).

[00300] Для FACS-анализа клетки окрашивали с помощью красителя cell tracker дальнего красного спектра для определения жизнеспособности (Invitrogen) и напрямую конъюгировали антитела к CD2, CD4, CD8 и CD25 (BD). Образцы анализировали с калибровочными микросферами для подсчета клеток. Для оценки специфичности уничтожения клетки-мишени гейтировали как популяции, положительные на Violet cell

tracker. Процент живых клеток-мишеней рассчитывали следующим образом: процент (%) жизнеспособных клеток =  $(R1/R2)*100$ , где R1=процент (%) живых клеток-мишеней в присутствии антитела, а R2=процент (%) живых клеток-мишеней в отсутствие исследуемого антитела. Активацию Т-клеток измеряли по проценту активированных (CD25<sup>+</sup>) Т-клеток из CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> или CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Количество Т-клеток измеряли путем расчета количества живых CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> клеток на калибровочную микросферу.

[00301] Уровни цитокинов, накопленных в среде, анализировали с использованием набора микросфер для проточной цитометрии для анализа цитокинов человека Th1/Th2/Th17, BD cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit, в соответствии с протоколом производителя.

[00302] Для FACS-анализа клетки окрашивали красителем для анализа жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне (Invitrogen, кат. № L34976). Непосредственно перед FACS-анализом в каждую лунку добавляли пятьсот тысяч ( $5 \times 10^5$ ) калибровочных микросфер. Для каждого образца собирали сто тысяч ( $1 \times 10^5$ ) микросфер. Для оценки специфичности уничтожения клетки гейтировали по живым популяциям, меченым Violet. Регистрировали процент живой популяции и использовали его для расчета выживаемости.

[00303] Активацию Т-клеток и повышающую регуляцию маркера PD-1 оценивали путем инкубации клеток с напрямую конъюгированными антителами к CD2, CD4, CD8, CD25 и PD-1, а также путем регистрации процента поздно активированных (CD25<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) Т-клеток и PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Т-клеток из общего количества Т-клеток (CD2<sup>+</sup>). Информация о напрямую конъюгированных антителах следующая: CD2, PE:CD2 (Cl:RPA-2.1), BD, кат. № 555327; CD4, PerCP-Cy5.5:CD4 (Cl:ОКТ-4), Biolegend, кат. № 317428; CD8, APC:CD8 (Cl:RPA-T8), Biolegend, кат. № 301049; CD25, BV510:CD25 (Cl:M-A251), BD, кат. № 563352; и PD-1, PE-Cy7:PD1 (Cl:EH12.2H7), Biolegend, кат. № 329918.

[00304] Супернатант анализируемых лунок из анализа МНПК человека оценивали на высвобождение цитокинов Th1/Th2 с использованием набора микросфер для проточной цитометрии BD cytometric bead array human kit (BD, кат. № 560484) и следуя протоколу производителя.

Результаты, краткие итоги и выводы:

[00305] На **фиг. 6А** и **6В** показано, что анти-PSMA $\times$ CD28 усиливало цитотоксическую активность bs13644D (анти-PSMA $\times$ CD3) в присутствии Т-клеток человека или яванского макака. Биспецифичное антитело к PSMA $\times$ CD3 было исследовано на предмет его способности индуцировать уничтожение наивными Т-клетками человека клеток-мишеней, экспрессирующих PSMA человека, в качестве единственного агента или в присутствии костимулирующего биспецифичного антитела к PSMA $\times$ CD28. В исследовании, показанном на **фиг. 6А** и **6В**, концентрацию антитела к PSMA $\times$ CD28 фиксировали на уровне 2,5 мкг/мл. Анти-PSMA $\times$ CD3 последовательно разводили 1:4. Антитела инкубировали с клетками в течение 96 часов. В **таблице 16** обобщены компоненты антител, использованных в этом исследовании.

**Таблица 16. Компоненты биспецифичных антител в исследованиях**

**цитотоксической эффективности**

Идентификатор продукта антитела	Формат антитела	Плечо PSMA [VH]	Плечо CD28 [VH]	Легкая цепь
bs16429D	PSMAxCD28	mAb11838P2	mAb14226P2	3-20 ULC
bs16431D	PSMAxCD28	mAb11810P2	mAb14216P2	1-39 ULC
bs13644D	PSMA (mAb11835P2)xCD3 (7221G)			1-39 ULC
bs17664D	Контроль EGFRvIIIxCD3(7221G)			1-39 ULC

[00306] Было проверено, могут ли иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 усиливать активацию Т-клеток и цитотоксичность в отношении клеток рака предстательной железы путем нацеливания на PSMA. С помощью анализа цитотоксичности и активации Т-клеток на основе FACS были протестированы иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 в комбинации с PSMAxCD3 (**фиг. 6, 7А-7D**). МНПК человека, содержащие Т-клетки, культивировали совместно с клетками рака предстательной железы C4-2, экспрессирующими эндогенно высокие уровни PSMA (данные не показаны). PSMAxCD28 значительно повышало эффективность цитотоксичности, индуцированной только PSMAxCD3, сдвигая EC50 с  $4,3 \times 10^{-11}$  до  $1,5 \times 10^{-12}$  (сдвиг в эффективности более чем на логарифм) (**фиг. 6 и 7А**). Согласно с индукцией Т-клеточной цитотоксичности, PSMAxCD28 повышало уровни высвобождения IFN $\gamma$ , индуцированного PSMAxCD3, в 4 раза (**фиг. 7В**). Точно так же комбинация PSMAxCD28 и PSMAxCD3 увеличивала количество CD4 и CD8 Т-клеток и экспрессию маркера активации CD25 (**фиг. 7С и 7D**). Никакого влияния на цитотоксичность или активацию Т-клеток не наблюдалось, когда иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 использовались в комбинации с ненацеленным биспецифичным антителом к CD3. Кроме того, чтобы продемонстрировать, что иллюстративное биспецифичное антитело к PSMAxCD28 может усиливать цитотоксичность PSMAxCD3 и активацию Т-клеток у нечеловекообразных приматов, были проведены такие же анализы с использованием МНПК от яванских макаков с получением аналогичных результатов (**фиг. 6, 7Е-7G**). Эти результаты продемонстрировали, что иллюстративное биспецифичное антитело к PSMAxCD28 может эффективно усиливать опосредованную PSMAxCD3 активацию Т-клеток не только посредством пролиферации и высвобождения цитокинов, но также за счет цитотоксичности. На **фиг. 7H** показано, что иллюстративное биспецифичное антитело к PSMAxCD28 связывается с клеточными мишенями согласно результатам анализа методом проточной цитометрии.

[00307] Биспецифичное антитело к PSMA x CD3 активировало и направляло Т-клетки человека на сокращение пула клеток C4-2 (линия клеток рака предстательной железы человека). Уничтожение клеток-мишеней отслеживали в присутствии биспецифичного антитела к PSMAxCD3, и клетки C4-2 были уничтожены дозозависимым образом со значениями EC<sub>50</sub> в пикомолярном диапазоне (**таблица 17**). Наблюдаемый лизис

клеток-мишеней был связан с повышающей регуляцией CD25+ и PD-1+ клеток на CD2+ Т-клетках, снова со значениями EC<sub>50</sub> в пиколярном диапазоне (**таблица 17**). Биспецифичное антитело к PSMAxCD3 индуцировало высвобождение человеческих цитокинов. Цитотоксическая активность, наблюдаемая для биспецифичного антитела к PSMAxCD3 при применении в качестве единственного агента, усиливалась в присутствии фиксированной концентрации костимулирующих молекул к PSMAxCD28 (биспецифичных антител) (**таблица 17**).

[00308] Таким образом, костимуляция биспецифичным антителом к PSMAxCD28 увеличивала активацию Т-клеток, повышающую регуляцию PD-1 и высвобождение цитокинов по сравнению с наблюдениями, сделанными при применении биспецифичного антитела к PSMAxCD3 в качестве единственного агента. В таблице 16 обобщены результаты экспериментов с использованием МНПК человека.

**Таблица 17. Влияние анти-PSMAxCD28 на цитотоксичность анти-PSMAxCD3 в отношении клеток С4-2 в присутствии МНПК человека**

Антитело	EC <sub>50</sub> уничтожения С4-2 [М]	EC <sub>50</sub> активации Т- клеток [М] (CD8+/CD25+)	EC <sub>50</sub> повышающей регуляции PD-1 [М] (CD4+/PD1+)
Анти-PSMAxCD3	4,35E-11	7,53E-11	3,03E-11
Анти-PSMAxCD3 +bs16429D	1,45E-12	4,95E-12	3,71E-12
Анти-PSMAxCD3 +bs16431D	4,88E-12	6,44E-12	4,38E-12

[00309] Биспецифичное антитело к PSMAxCD3 также было исследовано на предмет его способности индуцировать уничтожение наивными Т-клетками яванского макака клеток-мишеней, экспрессирующих PSMA человека, в качестве единственного агента или в присутствии костимулирующего биспецифичного антитела к PSMAxCD28. При выбранном титре антитела биспецифичное антитело к PSMAxCD3 активировало Т-клетки человека, но не направляло Т-клетки на сокращение пула клеток С4-2 (**таблица 18**). Костимуляция антителом к PSMAxCD28 привела к повышению активации Т-клеток, усилению цитотоксической активности и повышающей регуляции маркера PD-1 на Т-клетках (**таблица 18**).

**Таблица 18. Влияние анти-PSMAxCD28 на цитотоксичность анти-PSMAxCD3 в отношении клеток С4-2 в присутствии МНПК яванского макака**

Антитело	EC <sub>50</sub> уничтожения С4-2 [М]	EC <sub>50</sub> активации Т-клеток [М] (CD8+/CD25+)	EC <sub>50</sub> повышающей регуляции PD-1 [М]
----------	---	--	---

			(CD4+/PD1+)
Анти-PSMAxCD3	Н/Д	1,71E-10	2,29E-10
Анти-PSMAxCD3 +bs16429D	1,55E-11	1,64E-11	5,64E-12
Анти-PSMAxCD3 +bs16431D	7,72E-11	2,76E-11	2,66E-11

Пример 9. Высвобождение цитокинов из клеток

[00310] Как указано в других местах в настоящем документе, анализы высвобождения цитокинов *ex vivo* с использованием МНПК человека в «растворимом» формате не смогли предсказать высвобождение цитокинов. Для этого были разработаны форматы анализа с «покрытием».

[00311] Биспецифичные антитела к PSMA/CD28 и антитела к CD28 согласно настоящему изобретению оценивали на их способность индуцировать пролиферацию МНПК человека и высвобождение цитокинов из клеток с использованием формата анализа с покрытием. Для анализа пролиферации МНПК использовали свежесыведенные МНПК в количестве  $1 \times 10^5$ /лунку. Для совместного культивирования добавляли клетки С4-2, обработанные митомицином С, в количестве  $1 \times 10^4$  лунку. Разведения антител наносили на планшеты мокрым или сухим способом в течение ночи. Планшеты промывали перед добавлением МНПК. Супернатанты собирали примерно через 54 часа для анализа цитокинов с помощью Meso Scale Diagnostics (MSD, Роквилл, Мэриленд). Добавляли  $^3\text{H}$  тимидин на 18 часов и измеряли пролиферацию.

[00312] Результаты показали, что растворимое биспецифичное антитело к PSMA x CD28 индуцировало пролиферацию МНПК человека в присутствии стимула CD3. Напротив, суперагонист к CD28 индуцировал пролиферацию МНПК человека в отсутствие стимула CD3 (данные не показаны).

[00313] Кроме того, bs16429D (PSMA x CD28 «А») и mAb14226P2 (родительское к CD28 «А»), нанесенные мокрым способом, индуцировали меньшее высвобождение цитокинов, чем суперагонист к CD28, нанесенный мокрым способом, тогда как bs16431D (PSMA x CD28 «В») и mAb14216P2 (родительское к CD28 «В») не индуцировали значительно большего высвобождения цитокинов по сравнению с контролем (данные не показаны).

[00314] Антитело к CD28 согласно настоящему изобретению демонстрирует несколько свойств, отличающихся от суперагониста TGN1412. Считается, что обычные агонистические моноклональные антитела к CD28 (несуперагонисты) связываются с мембранно-дистальными эпитопами, обеспечивая только моновалентное связывание антител (Dennehy *et al.*, Cutting Edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses, J. of Immunol. 176(10): 5725-29 (2006)). Антитела к CD28 управляют оптимальной активацией Т-клеток в присутствии антигенспецифичного распознавания пептида-ГКГС с помощью TCR. Передача сигналов CD28 регулирует порог

активации TCR и значительно снижает количество взаимодействий TCR, необходимых для эффективной активации Т-клеток. Напротив, антитело к CD28 TGN обладало некоторыми суперагонистическими свойствами (Luhder *et al.*, Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists, J. of Exp. Med. 197(8): 955-966 (2003)); Riley *et al.*, the CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation, Blood, 105(1): 13-21 (2005)). Например, антитело к CD28 TGN индуцировало мощную пролиферацию Т-клеток и продукцию IL2 *in vitro* и *in vivo* даже в отсутствие передачи сигналов TCR, усиливало активность NF-κB более эффективно, чем обычная передача сигналов антителом к CD28/CD3, и индуцировало активацию AP-1/SRE, и связывалось с эпитопами CD28 вблизи клеточной поверхности, обеспечивая возможность двухвалентного связывания.

[00315] Соответственно, как показано на **фиг. 8**, суперагонист к CD28 TGN 1412 активировал репортер AP-1 в отсутствие первичной стимуляции CD3. Напротив, антитело к CD28 согласно данному изобретению (родительское антитело для PSMA x CD28) минимально активировало AP-1 в биоанализе люциферазного репортера AP-1.

Пример 10. Исследование антитела к PSMAxCD28 *in vivo*

Модель сингенной опухоли

[00316] В согласии с исследованием *in vitro* в примере 8, комбинация нацеленных на опухолевый антиген биспецифичных антител к CD3xPSMA и CD28xPSMA повышала элиминацию опухоли в модели на мышах. Для проверки эффективности биспецифичного антитела к PSMAxCD28 в качестве монотерапии или в комбинации с биспецифичным антителом к PSMAxCD3 были проведены эксперименты с сингенными опухолями на мышах, экспрессирующих CD28 человека, CD3 человека и PSMA человека вместо соответствующих мышиных генов, полученных с использованием собственной технологии Velocigene (мышь hCD3/hCD28/hPSMA). Был сделан вывод, что биспецифик к PSMAxCD28 усиливает противоопухолевый иммунитет *in vivo* за счет активации Т-клеток, индуцированной анти-PSMAxCD3.

[00317] Активация Т-клеток инициируется после связывания комплекса Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3 с комплексами пептид-ГКГС («сигнал 1»); затем активация усиливается за счет задействования второго «костимулирующего» рецептора, такого как рецептор CD28 на Т-клетках, связывающегося с его когнатным лигандом(ами) на клетке-мишени («сигнал 2»). Недавно описанные «биспецифичные антитела» на основе CD3 действуют путем замены обычного сигнала 1, связывая Т-клетки с опухолевыми клетками путем связывания опухолеспецифичного антигена (TSA) с одним плечом биспецифичного антитела и соединения посредством другого плеча с TCR/CD3. Хотя некоторые из этих биспецификов TSAxCD3 продемонстрировали многообещающую противоопухолевую эффективность у онкологических больных, их активность еще предстоит оптимизировать. Как описано в других местах в настоящем документе, в настоящем изобретении вводится новый класс биспецифичных антител, которые имитируют сигнал 2, соединяя второй TSA с костимулирующим рецептором CD28 на Т-клетках. Эти биспецифичные антитела

называют биспецификами TSAxCD28 или биспецификами к TSA/CD28. Как описано в настоящем документе, одно иллюстративное антитело согласно по настоящему изобретению специфично в отношении антигенов рака предстательной железы (например, PSMA). В отличие от суперагонистов к CD28, которые активируют широкий спектр Т-клеток и в некоторых случаях приводили к значительной токсичности в ранних клинических испытаниях, эти биспецифики TSAxCD28 проявляют ограниченную активность и не токсичны при использовании по отдельности в моделях на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах или у приматов. Однако в комбинации с биспецифичными антителами к TSAxCD3 иллюстративное антитело согласно изобретению повышало искусственный синапс между Т-клеткой и ее клеткой-мишенью, усиливало активацию Т-клеток и заметно улучшало противоопухолевую активность CD3-биспецификов в моделях сингенных опухолей. Сочетание этого нового класса CD28-костимулирующих биспецифичных антител с развивающимся классом биспецификов TSAxCD3 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию варианты антителотерапии с потенциально повышенной противоопухолевой эффективностью.

[00318] Способность Т-клеток распознавать и уничтожать свои клеточные мишени, такие как инфицированные вирусом клетки или опухолевые клетки, зависит от согласованного набора взаимодействий. Прежде всего они включают распознавание и связывание клетки-мишени комплексом TCR (который включает связанные  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -цепи CD3); это взаимодействие было названо «сигналом 1» для активации Т-клеток. TCR может распознавать вирусный или опухолевый пептид, презентируемый в бороздке белков ГКГС, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней. Это связывание обычно имеет низкую аффинность; поэтому для успешного запуска сигнала 1 важно иметь кластеризацию многих комплексов TCR вдоль границы раздела между Т-клеткой и ее клеткой-мишенью, и эта граница раздела была названа иммунным синапсом (J. В. Huppa, M. M. Davis, T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003)). Активация и пролиферация Т-клеток затем дополнительно стимулируются дополнительными взаимодействиями с костимулирующими рецепторами, такими как CD28 («сигнал 2») (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). Когда Т-клетка распознает клетку-мишень посредством комплекса TCR и задействует сигнал 2 посредством связывания CD28 с его когнатным лигандом(ами) (CD80/B7.1 и/или CD86/B7.2) на профессиональной антигенпрезентирующей клетке или клетке-мишени, активация Т-клеток повышается. Как и в случае с сигналом 1, опосредованный CD28 сигнал 2, вероятно, возникает в результате совместной кластеризации в иммунном синапсе.

[00319] Обычные моноклональные антитела, нацеленные против опухолеспецифичных антигенов (TSA), использовались в качестве противоопухолевых терапевтических средств на протяжении последних двух десятилетий (G. Salles *et al.*, Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther* **34**, 2232-2273 (2017); M. V. Mateos *et al.*, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan,

and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med* **378**, 518-528 (2018); W. Eiermann, G. International Herceptin Study, Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trial data. *Ann Oncol* **12 Suppl 1**, S57-62 (2001); J. M. Connors *et al.*, Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* **378**, 331-344 (2018); V. Dieras *et al.*, Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**, 732-742 (2017)). Однако этот класс антител обладал ограниченной способностью индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность, и вместо этого действовал путем стимуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), или путем доставки токсина в опухолевые клетки. Недавно появился новый класс биспецифичных антител (TSAxCD3), которые могут эффективно запускать опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток, связывая Т-клетку с опухолевой клеткой и активируя комплекс CD3/TCR (обычно через эпсилон-цепь CD3) с помощью заместительного механизма, тем самым имитируя сигнал 1. Ранняя версия такого биспецифика (одно плечо связывается с CD19 на клетках лейкоза, а второе связывается с CD3) недавно получила одобрение надзорных органов для лечения В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (R. Bargou *et al.*, Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody. *Science* **321**, 974-977 (2008); H. Kantarjian *et al.*, Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **376**, 836-847 (2017)). Недавно было показано, что улучшенные версии биспецификов обладают хорошей активностью против неходжкинских лимфом, нацеливая CD20 на эти лимфомы (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of Bcells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015); L. L. Sun *et al.*, Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med* **7**, 287ra270 (2015); M. Bacac *et al.*, CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* **24**, 4785-4797 (2018); R. Bannerji *et al.*, Emerging Clinical Activity of REGN1979, an Anti-CD20 x Anti-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma (FL), Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) Subtypes. *American Society of Hematology*, (2018); L. Budde *et al.*, Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study. *American Society of Hematology*, (2018)). Однако, хотя биспецифики TSAxCD3 получили развитие как важный новый класс иммунотерапии при гемобластозах, перекрестные сравнения между исследованиями (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016)) дают основания полагать, что в некоторых случаях они могут не достичь уровня эффективности, наблюдаемого для терапии персонализированными Т-

клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T).

[00320] Одна из причин высокой эффективности CAR-T-клеточной терапии заключается в том, что химерный антигенный рецептор (CAR) генетически модифицирован для обеспечения как сигнала 1 (через часть цитодомена CD3z), так и сигнала 2 (например, через часть цитодомена CD28) при связывании со своей мишенью на опухолевой клетке. Два вида CAR-T-клеточной терапии недавно получили одобрение FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, оба из которых действуют путем связывания антигена CD19 и нацеливания на него (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017)). Подходы с использованием CAR-T-клеток могут быть связаны с серьезными побочными действиями, такими как синдром высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичность (S. S. Neelapu *et al.*, Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 47-62 (2018); J. Gust *et al.*, Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* **7**, 1404-1419 (2017); A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018)); и из-за высоко персонализированных процессов производства и необходимости проведения предварительной химиотерапевтической подготовки (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017); P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry? *Pharm Res* **35**, 152 (2018)) многие пациенты не считаются подходящими кандидатами.

[00321] Преимущества биспецификов TSAxCD3 как относительно хорошо переносимых и готовых к использованию терапевтических решений для более широких популяций пациентов были бы увеличены, если бы их противоопухолевая активность могла быть дополнительно оптимизирована, особенно если бы это можно было сделать без ущерба для переносимости или, возможно, даже увеличить специфичность к опухолевым клеткам относительно здоровых клеток. С этой целью была выдвинута гипотеза, что применение биспецификов TSAxCD3 в паре с новым классом биспецификов, которые независимо активируют сигнал 2, может обеспечить потенциально повышенную эффективность, а также возможность для увеличения специфичности. Поэтому был разработан второй класс биспецификов. Эти биспецифики могут действовать либо второй эпитоп на том же опухолеспецифичном антигене, либо второй, отдельный опухолевый антиген, во взаимодействие с костимулирующим рецептором CD28 (биспецифики TSAxCD28), экспрессируемым на Т-клетках. Было высказано предположение, что комбинирование TSA1xCD3 с TSA2xCD28 должно обеспечить направленную и усиленную

имитационную активацию Т-клеток за счет запуска как сигнала 1, так и сигнала 2, со специфичностью, нацеленной только против опухолевых клеток, экспрессирующих оба эпитопа или оба антигена, что обеспечивает более высокую противоопухолевую активность вместе с потенциалом увеличения специфичности.

[00322] В настоящем документе описано получение и тестирование костимулирующих биспецифичных антител к TSAxCD28, нацеленных на рак предстательной железы (PSMAxCD28, которое связывает простатоспецифичный мембранный опухолевый антиген). Токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах, а также на яванских макаках демонстрируют, что эти биспецифики проявляют ограниченную активность и не обладают токсичностью при применении в качестве монотерапии. Однако эти новые костимулирующие биспецифики можно эффективно комбинировать с развивающимся классом биспецификов TSAxCD3 для усиления противоопухолевых ответов в моделях сингенных опухолей. В совокупности эти данные дают основания полагать, что комбинирование этого нового класса биспецификов на основе CD28 (TSAxCD28) с биспецификами на основе CD3 (TSAxCD3) может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной и синергической противоопухолевой активностью.

#### **Материалы и методы**

[00323] В примерах 10 и 13 использовали следующие материалы и методы.

##### *Исследования на сингенных опухолях*

[00324] Мыши, экспрессирующие CD28 человека, CD3 человека и PSMA человека вместо соответствующих мышинных генов (называемые гуманизированными мышами hCD3/hCD28/hPSMA), были получены с использованием технологии Velocigene®, как описано ранее (Valenzuela (2003), Nat Biotechnol, Jun;21(6):652-9; Crawford et al. 2018, рукопись на стадии подготовки). Для каждой гуманизированной мыши правильное нацеливание на гены в клонах эмбриональных стволовых (ES) клеток F1H4 (гибрид C57BL/6 × 129) было идентифицировано с помощью анализа потери аллелей, как описано ранее (Poueymirou et al (2007), Nat Biotechnol, Jan;25(1):91-9). Нацеленные ES клетки инъецировали эмбрионам Swiss Webster на 8-клеточной стадии для получения полностью гетерозиготных мышей поколения F0 для скрещивания с мышами C57BL/6N (Taconic, Ренселер, Нью-Йорк) до гомозиготности. Мышам hCD3/hCD28/hPSMA (4-8 мышей/группа, возраст 8-16 недель) подкожно инъецировали  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток MC38/hPSMA. Биспецифичное антитело к PSMAxCD28, биспецифичное антитело к PSMAxCD3 или IgG4 человека изотипического контроля вводили в виде монотерапии или в комбинации путем внутрибрюшинной инъекции в 0, 3 и 7 день в дозе 5 мг/кг.

[00325] Динамику роста опухоли контролировали, используя штангенциркуль для измерения диаметра X и Y. Рассчитывали объем опухоли ( $X \times Y \times (X/2)$ ). Мышей умерщвляли, когда опухоли вырастали до размера, превышающего 2000 мм<sup>3</sup>.

##### *Измерение уровней цитокинов в сыворотке мышей*

[00326] В указанные моменты времени кровь собирали посредством пункции подчелюстной вены в пробирки для сыворотки microtainer (BD 365967). Уровни цитокинов анализировали с использованием набора V-plex Human ProInflammatory-10 Plex в соответствии с инструкциями производителя (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд).

#### **Результаты, краткие итоги и выводы**

[00327] Экспрессия CD28 человека на Т- и NK-клетках была подтверждена с помощью FACS (данные не показаны). Функциональные характеристики трижды гуманизированных мышей подтверждали с использованием анализа пролиферации Т-клеток *in vitro* (данные не показаны). Экспрессия PSMA была подтверждена с помощью кПЦР (количественной ПЦР) (данные не показаны). У трижды гуманизированных мышей hCD3/hCD28/hPSMA (описано выше) контролировали динамику роста опухоли MC38/hPSMA (фиг. 9А). По сравнению с изотипическим контролем монотерапия как PSMAxCD3, так и PSMAxCD28 значительно ингибировала рост опухоли ( $p < 0,001$  и  $p < 0,0001$ , соответственно). Рост опухоли был еще больше ингибирован комбинированной терапией ( $p < 0,00001$ ). По сравнению с изотипическим контролем комбинация биспецификов PSMAxCD3 и PSMAxCD28 обеспечивала наибольшую продукцию цитокинов (фиг. 9С и 9D). Чтобы лучше понять роль комбинированной терапии в состоянии активации внутриопухолевых CD8<sup>+</sup> Т-клеток, был проведен анализ viSNE (фиг. 9В). viSNE представляет собой инструмент для визуализации высокоразмерных цитометрических данных в 2D при сохранении высокоразмерной структуры. Каждый вариант лечения приводил к появлению уникальных кластеров CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке и опухоли. Комбинированная терапия стимулировала экспансию фенотипа активированных Т-клеток/Т-клеток памяти (экспрессирующих TCF1, CD1-2, CD127, PD-1, ICOS, KLRG1 и CD38), как показано в кластере 4 в опухоли.

[00328] Были проведены исследования для определения сывороточных уровней цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-4 и IL-5) как у мышей hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>, так и у мышей hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup>. Кровь брали в 0 (4 часа), 3, 7 и 11 день после лечения. За исключением IL-10 у мышей hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>, в 0 день уровни цитокинов значительно повысились при лечении, включавшем антитела к PSMAxCD3, а комбинированная терапия анти-PSMAxCD3 и анти-PSMAxCD28 привела к наибольшему высвобождению цитокинов. Напротив, контрольное IgG и монотерапия анти-PSMAxCD28 не вызывали увеличения продукции цитокинов. За исключением IL-5 и IL-10, продукция цитокинов снизилась через три (3) дня до аналогичного уровня во всех группах лечения. Продукция IL-5 была значительно выше на 3 день, хотя и ниже, чем в 0 день, у мышей hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup>, но не у мышей hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup>, получавших комбинированное лечение. У мышей hCD3<sup>+/+</sup>/hPSMA<sup>+/+</sup>/hCD28<sup>+/+</sup> продукция IL-10 была аналогичной для всех групп лечения в 0 день и на 3 день, но комбинированная терапия обеспечивала значительно более высокий уровень в комбинированной терапии на 7 день и 11 день. У мышей hCD3<sup>+/-</sup>/hPSMA<sup>+/-</sup>/hCD28<sup>+/-</sup> комбинированная терапия вызвала

значительно больше IL-10 в 0 день, 3 день и 11 день, но не на 7 день. Монотерапия анти-PSMAxCD3 вызвала значительно больше IL-10 в 0 день и 3 день, но не на 7 день и 11 день. Монотерапия анти-PSMAxCD28 вызвала значительно больше IL-10 только на 11 день (данные не показаны).

[00329] Как показано на **фиг. 9А**, в отличие от предыдущих анализов *in vitro*, в которых CD28-биспецифики имели очень ограниченную активность при применении в качестве монотерапии (см. пример 8 выше), CD28-биспецифики в этих сингенных моделях MC38/hPSMA имели более значительную активность при применении в качестве монотерапии. Это говорит о том, что «сигнал 1» уже был в некоторой степени активирован в этой модели MC38. В согласии с этими данными, ранее было показано, что опухолевые клетки MC38 экспрессируют высокие уровни реактивированных эндогенных ретровирусных белков, таких как p15E, и что мыши C57BL6 могут генерировать эндогенные Т-клетки, которые распознают этот неоэпитоп и отвечают на него (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). Действительно, было подтверждено, что в моделях MC38 могут легко быть обнаружены внутриопухолевые Т-клетки, отвечающие на этот неоантиген p15E. Таким образом, CD28-биспецифики в этих моделях сингенных опухолей могут усиливать эндогенные TCR/CD3-зависимые Т-клеточные ответы, которые затем могут быть дополнительно усилены путем обеспечения дополнительной активации «сигнала 1» посредством CD3-биспецифичного антитела.

[00330] Чтобы определить клеточный механизм, лежащий в основе комбинированной терапии, опухоль-инфильтрирующие и селезеночные CD8<sup>+</sup> Т-клетки были профилированы на основе этих экспериментов с помощью высокоразмерной проточной цитометрии и с использованием подходов неконтролируемой кластеризации. Было обнаружено, что каждый вариант лечения приводил к появлению уникальных кластеров CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке и опухоли. Схемы однократного лечения снижали уровни внутриопухолевых CD8<sup>+</sup> Т-клеток с менее активированным фенотипом (с более низкими уровнями ICOS, KLRG1, Ki67, PD1, CD38 и LAG3, **фиг. 9Е**), как показано в кластере С35. Однако комбинированная терапия значительно способствовала экспансии более активированного фенотипа Т-клеток/Т-клеток памяти (экспрессирующих Tcf1, CD122, CD127, PD1, ICOS, KLRG1 и CD38, **фиг. 9В**), как показано в кластере С4.

*Анти-CD28 x анти-PSMA не индуцирует повышения сывороточных уровней цитокинов у гуманизированных мышей CD28/CD3/PSMA в отсутствие и в присутствии опухоли*

[00331] Как указано в других местах в настоящем документе, TGN1412, антитело-суперагонист к CD28, вызвало «цитокиновый шторм», губительный для пациента. Антитело к CD28 и биспецифичное антитело к CD28xPSMA согласно изобретению не

вызывали цитокиновый шторм. В этом исследовании гуманизированным мышам hCD3/hCD28/hPSMA вводили несколько антител (обобщенно представленных в таблице 19) в дозировке 2,5 мг/кг или 0,25 мг/кг. Кровь у мышей брали через 4 часа и 3 дня после введения антител. Как показано на **фиг. 10**, биспецифичные антитела к PSMAxCD28 или родительские двухвалентные антитела к CD28 не индуцировали продукцию цитокинов в сыворотке у гуманизированных мышей CD3/CD28/PSMA в отсутствие опухоли.

**Таблица 19. Антитела для исследования цитокинового шторма у гуманизированных мышей hCD3/hCD28/hPSMA**

Идентификатор антитела	№ партии	Название
REGN1945	REGN1945-L49	hIgG4
mAb14226P2	REGN5705-L1	mAb к CD28
REGN2329 (TeGenero)	REGN2329-L3	Суперагонист (SA) к CD28
bs16429D	bs16429D-L2	PSMAxCD28
BE0146	614216J2B	PD1, RMP1-14
bs15780D	bs15780D-L2	PSMAxCD3

При 2,5 мг/кг TGN1412 может вызывать значительное повышение уровней IL-2, IL-4, IL-5 и TNF $\alpha$  в крови (данные не показаны).

[00332] Кроме того, как показано на **фиг. 28**, лечение анти-PSMAxCD28 по отдельности или комбинированное лечение антителом к PD1 не повышало сывороточные уровни цитокинов у мышей с опухолями. Напротив, лечение анти-PSMAxCD3, по отдельности или в комбинации с антителом к PD1, повышало сывороточные уровни цитокинов, таких как TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-2 и IL-4, у мышей с опухолями. Лечение анти-PSMAxCD3 индуцировало экспрессию цитокинов через 4 часа после введения дозы. Повышение уровней цитокинов не сохранялось по прошествии 7 дней. Это исследование было проведено на гуманизированных мышах hCD3/hCD28/hPSMA с опухолями MC38/hPSMA. Сыворотку собирали у гуманизированных мышей hCD3/hCD28/hPSMA с опухолями MC38/hPSMA через 4 часа после введения дозы в 0 день и 7 день, через 4 дня с 5 мг/кг указанных антител или биспецификов. Сывороточные уровни цитокинов измеряли с использованием 10-плексного набора для определения мышинных цитокинов методом MSD в соответствии с протоколом производителя.

[00333] Кроме того, как показано на **фиг. 11**, лечение суперагонистом к CD28 вызывало цитокиновый ответ через 4 часа у мышей NSG с привитыми МНПК, в отличие от антитела к CD28 согласно изобретению. В исследовании, показанном на **фиг. 11**, мышам NSG с иммунодефицитом прививали  $5 \times 10^6$  МНПК от нормального здорового донора на -10 день. В -1 день системное приживление Т-клеток подтверждали окрашиванием периферической крови на маркеры Т-клеток человека. В 0 день мышам внутрибрюшинно инъецировали 50 мкг антитела изотипического контроля IgG4, 5 мкг или 50 мкг суперагониста к CD28, или 5 мкг или 50 мкг антитела к CD28 mAb14226P2. Через четыре часа после инъекции антител у животных собирали кровь и получали сыворотку.

Концентрации цитокинов в сыворотке анализировали с помощью мультиплексного анализа (набор Meso Scale Discovery V-PLEX). В то время как суперагонист к CD28 вызывал повышенные сывороточные уровни интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-6 и TNF $\alpha$  по сравнению с животными, получавшими антитело изотипического контроля, в сыворотке животных, получавших mAb14226P2 к CD28, не наблюдалось увеличения цитокинового ответа. Соответственно, биспецифик к CD28xPSMA имеет потенциально более безопасный токсикологический профиль среди костимулирующих биспецифичных антигенсвязывающих молекул. Биспецифик к CD28xPSMA не вызывал цитокинового ответа, в отличие от биспецифика к CD3xPSMA. Как показано на **фиг. 12**, анти-CD3 x PSMA вызывало повышение IFN- $\gamma$  у гуманизированных мышей, в отличие от анти-CD28xPSMA. В этом исследовании сыворотку собирали у гуманизированных мышей CD3/CD28/PSMA или CD3/CD28 с опухолями MC38/hPSMA через 4 часа после введения дозы 5 мг/кг указанных биспецификов. Сывороточные уровни цитокинов измеряли с использованием 10-плексного набора для определения мышинных цитокинов методом MSD в соответствии с протоколом производителя. Точки на графике представляют собой индивидуальные уровни цитокинов на мышь. Столбцы на графике представляют собой среднее значение для каждой группы лечения. Планки погрешностей представляют собой +/- SEM. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Холма-Сидака, используя мышей, получавших изотип, в качестве контролей (\*\*,  $p < 0,01$ ).

[00334] В согласии с данными, полученными на гуманизированных мышах, биспецифичное антитело к CD3xPSMA вызывало повышенный уровень CRP (С-реактивного белка) и системное высвобождение цитокинов у нечеловекообразных приматов, яванских макаков. В исследовании на обезьянах биспецифичное антитело к CD3xPSMA вводили яванскому макаку в дозировке 0,01, 0,1 и 0,5 мг/кг. У обезьяны наблюдались следующие симптомы: клинические признаки на первый день, такие как рвота, выгибание спины, красная/измененного цвета кожа; повышенный уровень CRP (приблизительно 10 против 1 мг/дл у контрольных мышей); повышенные уровни цитокинов в плазме (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 и MCP); и падение абсолютного количества Т-клеток в крови (данные не показаны).

[00335] Более того, мыши, получавшие лечение анти-CD28xPSMA, не демонстрировали продукцию цитокинов или маргинацию Т-клеток по сравнению с лечением анти-PSMAxCD3 или суперагонистом к CD28 (**фиг. 13А и 13В**).

### **Резюме**

[00336] Давно известно, что активация Т-клеток через комплекс TCR («сигнал 1») может быть заметно усилена костимулирующими сигналами, такими как сигналы, которые опосредуются при взаимодействии рецептора CD28 на Т-клетках со своими лигандами (CD80/B7.1 и CD86/B7.2) на клетках-мишенях («сигнал 2») (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). В согласии с данными, раскрытыми в настоящем документе, потенциал

костимуляции CD28 для повышения противоопухолевой активности Т-клеток был впервые продемонстрирован в исследованиях, в которых лиганды B7 были сверхэкспрессированы на опухолевых клетках (R. H. Schwartz, Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068 (1992); L. Chen *et al.*, Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71, 1093-1102 (1992)), что показало улучшенное отторжение Т-клетками таких B7-экспрессирующих опухолей. Этот потенциал вдохновил попытки оценить активирующие CD28 антитела в испытаниях на людях. К сожалению, испытание такого антитела (TGN1412) в 2006 году привело к угрожающим жизни осложнениям у всех шести добровольцев (G. Suntharalingam *et al.*, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355, 1018-1028 (2006)), из-за полиорганной недостаточности в результате синдрома массивного высвобождения цитокинов (CRS). Эта катастрофа привела к прекращению любых дальнейших тестов активирующих CD28 антител на людях.

[00337] В настоящем документе описан новый класс костимулирующих биспецифичных антител к CD28, которые могут заметно и безопасно стимулировать противоопухолевую активность, обеспечивая костимулирующий «сигнал 2». Эти CD28-биспецифики сами по себе обладают ограниченной активностью (в отсутствие «сигнала 1»), но могут заметно усиливать противоопухолевую активность в условиях «сигнала 1», что может быть обеспечено путем применения этих CD28-биспецификов в паре с развивающимся классом CD3-биспецификов (или если эти CD28-биспецифики используются в условиях, при которых уже присутствуют эндогенные популяции опухолеспецифичных Т-клеток). В настоящем документе описано получение и тестирование костимулирующих биспецифичных антител к TSAxCD28, нацеленных на рак предстательной железы (PSMAxCD28). Было показано, что в отсутствие «сигнала 1» эти CD28-биспецифики обладают минимальной активностью *in vitro* или *in vivo*. Однако эти CD28-биспецифики можно применять в паре с CD3-биспецификами для образования искусственных «иммунных синапсов», содержащих опухолевые антигены, а также комплексы TCR и CD28. Более того, в паре с подходящими CD3-биспецификами *in vitro* эти CD28-биспецифики могут эффективно и специфично способствовать активации Т-клеток и уничтожению опухолевых клеток антиген-зависимым образом. Кроме того, эти CD28-биспецифики также эффективно усиливают противоопухолевую активность CD3-биспецификов *in vivo* зависимым от опухолевого антигена образом в моделях сингенных опухолей; в таких моделях CD28-биспецифики обладают минимальной активностью при монотерапии, кроме тех случаев, когда опухолеспецифичные Т-клетки уже присутствуют, и в таких условиях они, по-видимому, усиливают эту специфичную активность зависимым от опухолевого антигена образом. Кроме того, комбинированная терапия TSAxCD28 и TSAxCD3 значительно стимулирует экспансию внутриопухолевого фенотипа активированных Т-клеток/Т-клеток памяти *in vivo*. Наконец, токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах, а также на

яванских макаках демонстрируют, что эти биспецифики проявляют ограниченную активность и не обладают токсичностью при монотерапии по сравнению с обычными CD28-активирующими антителами.

[00338] Часто характеристика клинических препаратов-кандидатов, специфичных для человека, в области иммуноонкологии ограничивается тестированием на моделях ксеногенных опухолей с привитыми иммунными клетками человека. Хотя эти ксеногенные модели могут быть очень полезными, у них есть ограничения. Мыши, используемые в таких ксеногенных моделях, не экспрессируют опухолевую мишень человека в своих здоровых тканях, тем самым препятствуя оценке тестируемого агента в условиях нормальной тканевой экспрессии мишени. Действительно, если мишень обычно также экспрессируется на высоких уровнях в здоровых тканях, это может ограничить противоопухолевую эффективность за счет отклонения исследуемого агента от опухоли и может привести к токсичности для этих здоровых тканей - ничего из этого нельзя оценить на сингенных ксеногенной модели. Дополнительное ограничение может заключаться в активности привитых мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) человека, перенесенных иммунодефицитной мыши, которая может отличаться от активности нормальных Т-клеток хозяина, присутствующих в иммунокомпетентной системе. Чтобы преодолеть эти ограничения и улучшить модели для тестирования клинических препаратов-кандидатов, специфичных для человека, в настоящем изобретении были созданы дважды и трижды генетически гуманизированные мыши. В этих моделях опухолевые антигены были генетически гуманизированы, чтобы обеспечить их нормальную экспрессию в подходящих тканях хозяина, а компоненты CD3 и/или CD28 были генетически гуманизированы, чтобы позволить иммунокомпетентным клеткам-хозяевам отвечать на специфичные для человека клинические препараты-кандидаты. В этих генетически гуманизированных иммунокомпетентных сингенных моделях на животных было обнаружено, что CD28-биспецифики к опухолевой мишени PSMA усиливали противоопухолевую активность соответствующих CD3-биспецификов. Подобное повышение противоопухолевой эффективности различными биспецификами TSAxCD28 в нескольких доклинических моделях дает основания полагать, что этот терапевтический метод является надежным и не ограничивается конкретной моделью опухоли, а может иметь более широкое применение в качестве нового класса нацеленной иммунотерапевтической комбинации. В целом, результаты обращают внимание на то, что биспецифики TSAxCD28 могут действовать синергетически с биспецификами TSAxCD3 и могут обеспечить биологическое решение, которое может заметно повысить эффективность хорошо изученных биспецификов TSAxCD3 достаточно безопасным и хорошо переносимым образом, что оправдывает испытания в исследованиях на людях.

[00339] Биспецифики TSAxCD3 представляют собой многообещающий развивающийся класс иммунотерапии, но во многих случаях, несомненно, будет важна дальнейшая оптимизация противоопухолевой активности. Подобно тому, как в CAR-T-клеточных подходах использовали химерные рецепторы, которые искусственно

активируют как «сигнал 1», так и «сигнал 2», чтобы улучшить их противоопухолевую активность (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); S. L. Maude *et al.*, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448 (2018)), в данном изобретении показано потенциальное преимущество комбинирования CD3-специфичных препаратов (которые обеспечивают «сигнал 1») с CD28-биспецификами (которые обеспечивают «сигнал 2») для усиления противоопухолевой активности. В дополнение к практическим преимуществам, которые такой подход может иметь по сравнению с CAR-T-клеточной терапией - то, что он не требует трудоемкой подготовки клеточной терапии, которая должна быть индивидуально адаптирована для каждого пациента, а также не требует предварительного прохождения пациентами «лимфодеплеции» путем токсической химиотерапии, чтобы они могли получать такую клеточную терапию, часто связанной с побочными действиями (A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018); C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)), - биспецифичный подход согласно изобретению обеспечивает потенциал для повышения эффективности, а также повышенной безопасности и специфичности действия. Таким образом, можно воспользоваться преимуществом «сочетательного нацеливания», комбинируя CD3-биспецифик к одному антигену с CD28-биспецификом, специфичным ко второму антигену - повышенная эффективность будет иметь место только на опухолевых клетках, экспрессирующих оба антигена - таким образом, фокусируя уничтожение Т-клеток только на опухолевых клетках, экспрессирующих оба антигена, при ограничении «нецелевой токсичности» в здоровых тканях, экспрессирующих только один из антигенов. В совокупности данные, раскрытые в настоящем документе, дают основания полагать, что комбинирование биспецификов на основе CD28 с биспецификами на основе CD3 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной и синергической противоопухолевой активностью. Первоначальная проверка этой возможности в исследованиях на людях состоится в этом году.

Пример 11. Токсикологические исследования на яванских макаках

[00340] Эти исследования продемонстрировали, что PSMAxCD28 по отдельности или в составе комбинированной терапии не индуцирует системного действия Т-клеток по сравнению с суперагонистом к CD28 у яванских макаков. Иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 согласно изобретению усиливали активацию Т-клеток яванских макаков посредством TAAxCD3 (пример 8, **фиг. 7E-7G**). Для определения безопасности и переносимости иллюстративных биспецифичных антител к PSMAxCD28 согласно настоящему изобретению, по отдельности или в комбинации с анти-PSMAxCD3, было проведено исследование токсичности разовой дозы на яванских макаках. Самок или самцов яванских макаков распределяли по группам лечения, как указано в **таблице 20**.

**Таблица 20. Поисковое исследование токсичности разовой дозы анти-**

**PSMAxCD28 на обезьянах**

Группа	Лечение (разовая доза)	Общее количество животных	Уровни дозы/повышение дозы (30-минутая в/в инфузия)
		Самцы	
1	PSMAxCD3	3	0,1 мг/кг
2	bs16429D	3	1 мг/кг
3	bs16429D	3	10 мг/кг
4	Суперагонист «SA» к CD28	3	10 мг/кг
5	bs16429D+антитело к PD-1	3	10 мг/кг+10 мг/кг
6	bs16431D+антитело к PD-1	3	10 мг/кг+10 мг/кг
7	Ab изотипического контроля	3	10 мг/кг

[00341] Исследование на яванских макаках проводили в соответствии с рекомендациями IACUC (Институционального комитета по содержанию и использованию животных). Самцы яванских макаков (3 животных/группа) получали разовую дозу каждого исследуемого препарата посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно 30 минут (комбинированное лечение вводили в виде отдельной инфузии в течение в общей сложности 1 часа). Оценка токсичности основывалась на клинических наблюдениях, качественных показателях потребления корма, массе тела, неврологических обследованиях, показателях жизненно важных функций (температура тела, частота сердечных сокращений, пульсоксиметрия и частота дыхательных движений), а также лабораторной диагностике и патологической анатомии. Были собраны образцы крови и тканей для анализа на цитокины, иммунофенотипирования методом FACS, гистопатологии и токсикокинетической оценки. Уровни CRP анализировали на системе Roche Modular P 800. Цитокины измеряли с помощью Meso Scale Diagnostics (MSD, Роквилл, Мэриленд). Для проведения проточной цитометрии периферической крови кровь собирали в пробирки с калием и ЭДТА, лизировали, окрашивали указанными антителами, такими как антитело к CD3, антитело к Ki67 и антитело к ICOS (BD Biosciences), и анализировали с помощью FACS Canto II. После введения разовой дозы PSMAxCD28 в дозе 1 или 10 мг/кг не наблюдалось значительного высвобождения цитокинов, маргинации Т-клеток или повышающей регуляции маркера активации Т-клеток (**таблица 21**).



REGN232 9 (TeGenero )	суперагони ст к CD28	10	-	-	7,02	0,2 6	0,60	5,66	15,4	764	BL Q	3364	BL Q	BL Q	BL Q	BL Q	116 9
			-	-	7,06	0,1 9	0,79	7,29	15	2907	109 5	1715 5	333 Q	BL 238	BL Q	615	
			-	-	11,8 7	0,6 6	1,13	10,9 6	15,3	5226	532 4	7918	150 9	163 522	342 198		
mAb10154 P3	EGFRVIIIА b		-	-	6,39	5,6 2	0,62	0,39	0,8	BLQ	BL Q	BLQ	BL Q	151	BL Q	335	BL Q
		-	-	7,43	7,7 2	0,86	0,52	11	BLQ	BL Q	BLQ	BL Q	267	BL Q	378	BL Q	
		-	-	3,66	4,6 1	0,52	0,69	0,2	BLQ	BL Q	BLQ	BL Q	BL Q	BL Q	BL Q	BL Q	

BLQ: ниже нижнего предела количественного определения

[00342] Напротив, значительное высвобождение цитокинов, маргинация лимфоцитов и активация Т-клеток наблюдались у обезьян, которым вводили суперагонист к CD28. Кроме того, эти результаты были подтверждены с использованием анализа пролиферации Т-клеток человека с нанесением сухим и мокрым способом (пример 9). Действительно, индукция пролиферации Т-клеток человека иллюстративными биспецифичными антителами к PSMAxCD28, а также родительскими двухвалентными антителами к CD28 не наблюдалась по сравнению с антителом-суперагонистом к CD28. В целом поисковое исследование токсичности разовой дозы на обезьянах и анализы на основе Т-клеток человека *in vitro* дают основания полагать, что иллюстративные биспецифичные антитела к PSMAxCD28 согласно изобретению безопасны и хорошо переносятся.

[00343] Как показано в **таблице 21**, TGN1412, суперагонист к CD28, вызывал умеренное высвобождение цитокинов и временное увеличение уровней Т-клеток (измерено на 15 день). Исследование проводили на самцах яванского макака с еженедельным введением дозы от 5 до 50 мг/кг в течение 4 недель. FACS-анализ субпопуляций лейкоцитов проводили на самце яванского макака после в/в инъекции еженедельных (в 1, 8, 15, 22 день) нарастающих доз (5, 10, 25, 50 мг/кг) TGN1412. Наблюдалось умеренное повышение уровней IL-2, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  в первые 2-24 часа (в 2-20 раз). Существенных изменений в IL-4 или TNF- $\alpha$  не наблюдалось. Поисковое исследование токсичности разовой дозы анти-CD28xPSMA на обезьянах было проведено для установления безопасности и фармакокинетического профиля биспецифичного антитела к CD28xPSMA.

[00344] Таким образом, было показано, что антитела к CD28xPSMA усиливали иммунитет в месте опухоли. Анти-CD28xPSMA превращало опухолевые клетки в антигенпрезентирующие клетки (АПК). Антитела к CD28xPSMA не индуцируют пролиферацию Т-клеток и не стимулируют высвобождение цитокинов по сравнению с суперагонистом к CD28.

Пример 12. Картирование эпитопа связывания mAb14226P2 с CD28 посредством водородно-дейтериевого обмена

[00345] Было проведено картирование эпитопа с помощью H/D-обмена и масс-спектрометрии (HDX-MS) для определения аминокислотных остатков в CD28 (рекомбинантный CD28 человека, представлен как hCD28 ecto (N19-P152).mmh; SEQ ID NO: 75), взаимодействующих с моноклональным антителом к hCD28. Общее описание метода H/D-обмена изложено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00346] Эксперименты по HDX-MS проводили на интегрированной платформе для HDX/MS, состоящей из системы Leptec HDX PAL для мечения дейтерием и остановки реакции, Waters Acquity M-Class (вспомогательная система для работы с растворителями) для расщепления и загрузки образцов, Waters Acquity M-Class ( $\mu$ -двухканальная система для работы с растворителями) для аналитического градиента и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для измерения массы пептидов.

[00347] Раствор для мечения готовили в виде буфера PBS в D<sub>2</sub>O при рD 7,0 (10 mM

фосфатного буфера, 140 мМ NaCl и 3 мМ KCl, что эквивалентно pH 7,4 при 25 °C). Для мечения дейтерием 11 мкл CD28.mmH (белок REGN2011, самостоятельно полученный Regeneron, 127 мкМ) или CD28.mmH, предварительно смешанных с REGN5705 в молярном соотношении 1:0,6 (комплекс антиген-антитело), инкубировали при 20°C с 44 мкл раствора для мечения D<sub>2</sub>O для различных моментов времени, каждый в двух повторах (например, недейтерированный контроль=0 секунд; меченый дейтерием в течение 5 минут и 10 минут). Реакцию дейтерирования останавливали добавлением 55 мкл предварительно охлажденного буфера для остановки реакции (0,5 М TCEP-HCl, 8 М мочевины и 1% муравьиной кислоты) к каждому образцу и продолжали инкубацию в течение 5 минут при 20 °C. Затем образец с остановленной реакцией вводили в HDX Manager от Waters для экспресс-расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды разделяли на колонке C8 (1,0 мм x 50 мм, NovaBioassays) с 13-минутным градиентом 10%-32% В (подвижная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали методом масс-спектрометрии на Q Exactive HF в режиме ЖХ-МС/МС или ЖХ-МС.

[00348] Данные ЖХ-МС/МС недейтерированного образца CD28 сравнивали с базой данных, включающей CD28 и его рандомизированную последовательность, с помощью поисковой системы Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска (в ELN (электронный лабораторный журнал)) были установлены по умолчанию с использованием неспецифичного ферментативного расщепления и гликозилирования человеческих белков в качестве частой вариабельной модификации. Список идентифицированных пептидов был затем импортирован в программное обеспечение HDX Workbench (версия 3.3) для расчета поглощения дейтерия каждым пептидом, определяемым с помощью ЖХ-МС, из всех дейтерированных образцов. Для имеющегося пептида использовали центроидную массу (средневзвешенную по интенсивности массу) в каждый момент времени для расчета поглощения дейтерия (D) и процента поглощения дейтерия (%D).

Поглощение дейтерия (поглощение D) =  $\frac{\text{Средняя масса (дейтерированная)} - \text{средняя масса (недейтерированная)}}{\text{Максимальное поглощение D пептидом}}$

$$\text{Процент поглощения дейтерия } (\%D) = \frac{\text{Поглощение D пептидом в каждый момент времени} \times 100\%}{\text{Максимальное поглощение D пептидом (определено в ELN)}}$$

[00349] В общей сложности 73 пептида из hCD28.mmH (SEQ ID NO: 75) было идентифицировано как из hCD28.mmH в отдельности, так и из hCD28.mmH в комплексе с образцами антитела к CD28, что составляет 85,8% покрытия последовательности hCD28. Любой пептид, который демонстрировал процентное отношения поглощения D выше 5%, характеризовали как значительно защищенный. Для hCD28.mmH (SEQ ID NO: 75) области, соответствующие аминокислотам 5-20 (VKQSPMLVAYDNAVNL; SEQ ID NO: 77), 29-38 (FSREFRASHLH; SEQ ID NO: 78), 80-84 (YLQNL; SEQ ID NO: 79) и 91-108

(IYFCKIEVMYPPPYLDNE; SEQ ID NO: 80), были значительно защищены антителом к CD28, причем аминокислоты 91-108 (IYFCKIEVMYPPPYLDNE; SEQ ID NO: 80) были определены как основной эпитоп на CD28. Защита этих остатков антителом к CD28 была подтверждена с использованием hCD28.mFc (SEQ ID NO: 76). См. также таблицу 22 ниже, где обобщены результаты этого исследования.

**Таблица 22. Выбранные пептиды CD28.mmH со значительной защитой при связывании с антителом к CD28**

Остатк и CD28	Заряд (+)	5 мин			10 мин			$\Delta\%$ D
		REGN2011 + mAb14226P2			REGN2011 + mAb14226P2			
		Центроид ная МН <sup>+</sup>	Центроид ная МН <sup>+</sup>	$\Delta D$	Центроид ная МН <sup>+</sup>	Центроид ная МН <sup>+</sup>	$\Delta D$	
5-11	1	805,74	805,53	-0,21	805,83	805,58	-0,25	<b>-7,1</b>
5-11	2	806,69	806,48	-0,21	806,76	806,51	-0,24	<b>-7,1</b>
8-11	1	449,28	449,11	-0,16	449,33	449,16	-0,17	<b>-10,5</b>
12-19	1	869,61	869,30	-0,31	869,72	869,33	-0,39	<b>-7,2</b>
12-19	2	869,95	869,72	-0,23	870,08	869,69	-0,39	<b>-6,4</b>
12-20	1	982,96	982,54	-0,42	983,05	982,63	-0,41	<b>-7,4</b>
15-20	1	648,02	647,61	-0,40	648,06	647,68	-0,38	<b>-12,3</b>
29-32	1	540,44	540,06	-0,38	540,51	540,08	-0,44	<b>-25,4</b>
29-37	2	1116,66	1116,15	-0,51	1116,79	1116,20	-0,60	<b>-9,9</b>
29-37	3	1117,61	1117,74	-0,50	1117,11	1117,17	-0,57	<b>-9,6</b>
30-37	2	969,13	968,85	-0,28	969,23	968,90	-0,33	<b>-6,4</b>
30-38	3	1107,35	1106,93	-0,42	1107,48	1107,02	-0,46	<b>-7,8</b>
33-37	1	595,17	595,23	-0,12	595,05	595,08	-0,15	<b>-5,8</b>
33-38	1	732,40	732,24	-0,16	732,45	732,25	-0,19	<b>-5,5</b>
33-38	2	733,43	733,25	-0,18	733,48	733,29	-0,19	<b>-5,7</b>
80-84	1	652,81	652,51	-0,30	652,91	652,60	-0,31	<b>-12,6</b>
81-84	1	489,26	488,99	-0,28	489,34	489,04	-0,30	<b>-17,9</b>
91-93	1	443,49	443,50	-0,07	443,42	443,41	-0,09	<b>-10,1</b>
93-97	1	641,40	641,48	-0,58	640,83	640,89	-0,59	<b>-24,4</b>
94-105	2	1458,33	1456,70	-1,63	1458,63	1456,83	-1,80	<b>-30,7</b>
94-107	2	1688,09	1686,36	-1,73	1688,33	1686,43	-1,90	<b>-25,2</b>

94-108	2	1817,69	1816,15	-1,54	1817,88	1816,19	-1,69	<b>-20,2</b>
96-107	2	1455,75	1455,07	-0,68	1455,91	1455,09	-0,82	<b>-13,4</b>
98-107	2	1212,67	1212,07	-0,60	1212,78	1212,07	-0,70	<b>-16,3</b>
98-108	2	1342,17	1341,57	-0,60	1342,10	1341,61	-0,48	<b>-5,0</b>

Пример 13. Биспецифичные антитела к PSMA x CD28 эффективно повышают противоопухолевую эффективность иммунотерапии против PD-1

#### *Аннотация*

[00350] Активация Т-клеток усиливается за счет взаимодействия со вторым костимулирующим рецептором («сигнал 2»), помимо антигенспецифичной активации TCR/CD3 («сигнал 1»). Целью противораковой иммунотерапии является оптимальная активация и мобилизация Т-клеток для обнаружения и уничтожения опухолевых клеток. Однако современные методы лечения, как правило, не позволяют эффективно и селективно активировать Т-клетки в месте опухоли, часто не обеспечивая достижение длительных ответов и/или приводя к нежелательной токсичности. В настоящем документе был представлен новый нацеленный на опухоли иммунотерапевтический метод, сочетающий ингибирование PD-1 вместе с биспецифичными антителами. Биспецифичные антитела одним плечом связывают опухолеспецифичный антиген (TSA) (например, PSMA), а другим плечом - костимулирующий рецептор CD28 на Т-клетках. Действительно, ингибирование передачи сигналов PD-1-PD-L1 значительно увеличивает отношение CD28, накопленного в иммунологическом синапсе, что позволяет биспецифику TSAxCD28 оказывать свое действие. Эта комбинированная иммунотерапия была проверена с использованием биспецифичных антител, специфичных к антигену предстательной железы (например, PSMA). В отличие от неспецифичных суперагонистов к CD28, которые активируют широкий спектр Т-клеток, биспецифики TSAxCD28 хорошо переносились при применении отдельно или в комбинации с блокатором PD-1 в моделях на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах или у приматов. Важно отметить, что в присутствии эндогенного триггера TCR/CD3 TSAxCD28 разительным образом улучшал противоопухолевую активность антитела к PD-1, связанную с длительными противоопухолевыми ответами. Комбинированная терапия специфично усиливала внутриопухолевую активацию Т-клеток, способствуя эффекторному фенотипу Т-клеток, подобному Т-клеткам памяти, без системной секреции цитокинов в различных моделях сингенных и ксенотрансплантатов опухолей человека. Комбинация этого класса CD28-костимулирующих биспецифичных антител с успешно прошедшим клинические исследования лечением антителом к PD-1 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию варианты антителотерапии с ощутимо повышенной противоопухолевой эффективностью.

#### *Введение*

[00351] Множество моноклональных антител (mAb), предназначенных для усиления активации Т-клеток, проходят клинические исследования в качестве противоопухолевых

терапевтических средств (М. К. Callahan, М. А. Postow, J. D. Wolchok, Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* **44**, 1069-1078 (2016)). Однако большинство современных методов лечения сталкиваются с проблемой преодоления ингибирующего характера микроокружения опухоли, что приводит к неспособности генерировать эффективную опухолеспецифичную активацию Т-клеток и последующее уничтожение опухолевых клеток (К. G. Anderson, I. M. Stromnes, P. D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Cell* **31**, 311-325 (2017)). Для нескольких блокирующих моноклональных антител, направленных против ингибиторов контрольных точек, таких как цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок (CTLA-4) и белок программируемой клеточной смерти 1 (PD-1)/лиганд белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), одобрено проведение клинических исследований лечения меланомы, почечно-клеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого и распространенной метастатической плоскоклеточной карциномы кожи (J. S. Weber *et al.*, Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375-384 (2015); S. L. Topalian *et al.*, Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**, 1020-1030 (2014); М. А. Postow, М. К. Callahan, J. D. Wolchok, Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974-1982 (2015); М. R. Migden *et al.*, PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **379**, 341-351 (2018)). Блокирование PD-1 снимает ограничения по активации Т-клеток, однако его эффективности в качестве монотерапии часто недостаточно для достижения элиминации опухоли и длительных противоопухолевых ответов. В комбинации анти-PD-1/PD-L1 и анти-CTLA-4 действительно дают высокую частоту ответа при некоторых типах опухолей, но часто наблюдаются выраженные токсические эффекты (J. Larkin *et al.*, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **373**, 23-34 (2015); D. B. Johnson *et al.*, Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **375**, 1749-1755 (2016); М. H. Pollack *et al.*, Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD1 in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **29**, 250-255 (2018); J. D. Wolchok *et al.*, Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369**, 122-133 (2013)). Следовательно, продолжают предприниматься значительные усилия по выявлению пациентов, которые с большей вероятностью будут отвечать на ингибирование контрольных точек путем идентификации биомаркеров, прогнозирующих ответ на терапию (R. Cristescu *et al.*, Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* **362**, (2018)). Кроме того, проходят доклиническую и клиническую оценку комбинированные терапии, предназначенные для повышения эффективности блокады PD-1 и длительности противоопухолевого ответа путем комбинирования с агонистическими антителами, запускающими костимулирующие рецепторы, или с другими методами, такими как химиотерапия или радиационная терапия (S. Hu-Lieskovan, A. Ribas,

New Combination Strategies Using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 Checkpoint Inhibitors as a Backbone. *Cancer J* **23**, 10-22 (2017); Y. K. Chae *et al.*, Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer* **6**, 39 (2018); P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* **283**, 110-120 (2018); B. Wang *et al.*, Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8(+) T cell dysfunction and maintain memory phenotype. *Sci Immunol* **3**, (2018); S. Chen *et al.*, Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model. *Cancer Immunol Res* **3**, 149-160 (2015)). Микросателлитная нестабильность и высокая мутационная нагрузка генерируют потенциальные эндогенные антигены, которые экспрессируются при определенных видах рака (K. W. Mouw, M. S. Goldberg, P. A. Konstantinopoulos, A. D. D'Andrea, DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discov* **7**, 675-693 (2017)). Т-клетки распознают эти мутировавшие пептиды как неоантигены (M. Efremova, F. Finotello, D. Rieder, Z. Trajanoski, Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* **8**, 1679 (2017)). Однако в изолированных условиях презентации этих антигенов недостаточно, чтобы способствовать устойчивой активации Т-клеток для генерации противоопухолевой активности (S. Spranger, R. Bao, T. F. Gajewski, Melanoma-intrinsic beta-catenin signaling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231-235 (2015)). Вероятно, это связано с иммуноингибирующим микроокружением опухоли.

[00352] В настоящем документе описан новый иммунотерапевтический метод с применением биспецификов к TSAxCD28, нацеленных на TSA рака предстательной железы PSMAxCD28, которые в комбинации с блокирующим PD-1 антителом индуцировали длительный противоопухолевый иммунитет и способствовали устойчивой внутриопухолевой активации Т-клеток и Т-клеточной памяти без признаков системного высвобождения цитокинов в моделях опухолей на животных. Токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах и на яванских макаках продемонстрировали, что эти биспецифики не проявляют токсичность сами по себе или в комбинации с антителом к PD-1. В совокупности эти данные дают основания полагать, что комбинирование этого класса биспецификов на основе CD28 (TSAxCD28) с ингибированием PD-1 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной, специфичной и синергической противоопухолевой активностью.

Материал и методы

[00353] В примере 13 были использованы следующие материалы и методы.

*План исследования*

[00354] В качестве примера одной из целей данного изобретения можно привести разработку биспецифичного антитела к TSAxCD28 и демонстрацию того, что TSAxCD28

усиливает индуцированную PD-1 активацию Т-клеток *in vitro* и безопасно повышает противоопухолевую эффективность *in vivo*. Активность *in vitro* была продемонстрирована путем демонстрации изображений биспецифичных антител, PD-1 и CD28, локализованных в иммунологическом синапсе конъюгатов Т-клеток и клеток-мишеней, усиления высвобождения цитокинов Т-клетками под действием PD-1. Противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивали на модели сингенной опухоли у мышей. Динамику объемов опухолей и сывороточных уровней цитокинов контролировали, чтобы продемонстрировать ответ на лечение биспецифичными антителами. Одной из целей исследований на яванских макаках было определение безопасности и переносимости (фармакологический и токсикологический профиль) TSAxCD28 в качестве монотерапии или в комбинации с PD-1 у нечеловекообразных приматов. Животных исследовали на предмет токсичности путем клинических наблюдений и сбора образцов крови для анализа сывороточных уровней цитокинов и фенотипа Т-клеток.

#### *Исследования на животных*

[00355] Все процедуры проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных НИИ. Протоколы были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Regeneron Pharmaceuticals.

#### *Линии клеток*

[00356] Клон Jurkat E6-1 (ATCC, № TIB-152), Raji (ATCC, № CCL-86™), линию клеток HEK293 (ATCC, № CRL-1573) и A-431 (ATCC, CRL-1555™) культивировали в соответствии с рекомендованным протоколом ATCC. Линию клеток HEK293/hCD20 получали с использованием вектора для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующего управляемый промотором убиквитина hCD20 (аминокислоты с M1 по P297 под регистрационным номером NP\_068769.2). Трансфицированные клетки культивировали в 500 мкг/мл генетицина А (G418) для отбора стабильно экспрессирующих линий клеток. Для получения клетки, экспрессирующей hCD80 или hPDL1, использовали лентивирусную плазмиду, кодирующую CD80 человека (длина 288 амк; регистрационный № NM\_005191.4) и ген устойчивости к неомицину, или PDL1 человека (длина 290 амк; регистрационный № NM\_14143.4) и ген устойчивости к пурамицину, для трансфекции клеток HEK293T, способствуя продуцированию вирусных частиц, которые впоследствии были использованы для инфицирования клеток HEK293/hCD20 или Raji. CD80- или PDL1-положительные клетки человека выделяли с помощью FACS. Клетки Jurkat трансдуцировали NFκB-Luc с использованием лентивируса от Qiagen (кат. № CLS-013L) и лентивирусной плазмиды, кодирующей PD-1 человека и ген устойчивости к пурамицину. Все полученные линии клеток поддерживали в DMEM+10% FBS+P/S/G+NEAA с добавкой 500 мкг/мл G418 и/или 0,5 мкг/мл пурамицина.

[00357] Линию клеток DU145/hPSMA получали путем трансдукции клеток DU145 (ATCC, HTB-81) вирусными частицами, которые были продуцированы клетками HEK293T, трансфицированными лентивирусной плазмидой, кодирующей PSMA человека

(аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609) и ген устойчивости к неомицину. После инфицирования клетки культивировали в 500 мкг/мл генетицина А (G418) для отбора клеток, стабильно экспрессирующих PSMA. Созданную линию клеток, DU145/PSMA, поддерживали в MEM+10% FBS+P/S/G с 500 мкг/мл G418.

[00358] Для создания линий опухолевых клеток, генетически модифицированных для экспрессии костимулирующих лигандов, использовали лентивирусную плазмиду pLVX с промотором EF1a, кодирующую мышинный CD86 или пустой вектор и ген устойчивости к пурамицину (pLVX.EF1a.CD86-puro и pLVX.EF1a.EV-puro, соответственно), для трансфекции клеток НЕК293Т, способствуя продуцированию вирусных частиц, которые впоследствии были использованы для инфицирования МС38 (Национальный институт онкологии США, лаборатория опухолевой иммунологии и биологии). Генетически модифицированные линии клеток, экспрессирующие CD86, выделяли с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Клетки поддерживали в условиях, рекомендованных АТСС, в присутствии 0,5 мкг/мл пурамицина. Полученные линии клеток были названы МС38/CD86 и МС38/EV.

[00359] Для получения клеток МС38/hPSMA использовали лентивирусную плазмиду, кодирующую PSMA человека (аминокислоты с M1 по A750 под регистрационным номером Q04609) и ген устойчивости к неомицину, для трансфекции клеток НЕК293Т, способствуя продуцированию вирусных частиц, которые впоследствии были использованы для инфицирования родительских клеток МС38. PSMA-положительные клетки человека выделяли с помощью FACS. МС38/hPSMA поддерживали в DMEM+10% FBS+P/S/G+NEAA с добавкой 500 мкг/мл G418.

#### *Amnis Image Stream*

[00360] Amnis Image Stream проводили, как описано в примере 7.

#### *Выделение первичных CD3<sup>+</sup> Т-клеток человека*

[00361] Выделение Т-клеток проводили, как описано в примере 8.

#### *Высвобождение IL-2 из первичных CD3<sup>+</sup> Т-клеток в реакции MLR с клетками DU145/PSMA*

[00362] Ранее выделенные и замороженные CD3<sup>+</sup> Т-клетки человека размораживали в день проведения анализа в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавками 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA и 0,01 мМ BME), содержащей 50 Ед/мл бензоназной нуклеазы. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, повторно суспендировали в стимулирующей среде и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/лунку. Родительские клетки DU145 или клетки DU145, генетически модифицированные для экспрессии PSMA человека, обрабатывали 25 мкг/мл митомицина С в стимулирующей среде для первичного посева в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл. После инкубации в течение 1 часа при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, обработанные митомицином С клетки 3 раза промывали D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли в лунки, содержащие CD3<sup>+</sup> Т-клетки в конечной концентрации  $5 \times 10^4$  клеток на лунку. Чтобы предотвратить проявление возможной агонистической активности CD28

посредством заякоривания Fc-домена антитела к CD28 на Fc-рецепторах, в каждую анализируемую лунку было включено насыщающее количество неспецифического антитела человека IgG (100 нМ каждого: hIgG1, hIgG4 и hIgG4s). Затем антитела PSMA x CD28, контрольное ненацеленное x CD28 или изотипический контроль hIgG4s титровали от 30 пМ до 200 нМ с разведением 1:3 и добавляли в лунки. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала титруемых антител. Поскольку клетки DU145 эндогенно экспрессируют PD-L1, влияние подавления активности Т-клеток посредством PD-1 оценивали путем добавления в лунки постоянной концентрации 20 нМ антагониста PD-1 REGN2810. Также было включено условие в отсутствие ингибирования PD-1, где вместо него использовали 20 нМ изотипически сходного контроля hIgG4. Планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, а затем центрифугировали для осаждения клеток. Собирали 50 мкл супернатанта среды, и из этого объема 5 мкл тестировали в анализе IL-2 человека методом AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения делали на многоканальном планшетном анализаторе Envision от Perkin Elmer. Была построена градуировочная кривая известных концентраций IL-2 для экстраполяции пг/мл IL-2 или IFN $\gamma$ , генерированных в анализируемых лунках. Все последовательные разведения были протестированы в двух повторах. Значения EC<sub>50</sub> антител определяли из четырехпараметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™.

#### *Анализ цитотоксичности на основе FACS*

[00363] Анализ цитотоксичности на основе FACS проводили, как описано ранее (пример 8).

#### *Исследования на сингенных опухолях*

[00364] MC38/EV и MC38/CD86 культивировали в соответствии с рекомендациями ATCC. 1×10<sup>6</sup> MC38/EV или MC38/CD86 подкожно имплантировали мышам C57BL/6. Мышам вводили антитело к PD-1 (RPM1-14, BioXcell) или крысиный изотипический контроль IgG2a (BioXcell) в дозе 5 мг/кг путем внутрибрюшинной инъекции в 0, 3, 7, 10 и 14 день после имплантации опухоли. Размеры опухолей измеряли дважды в неделю штангенциркулем (Roboz RS-6466). Объем опухоли рассчитывали по формуле X\*Y\*(X/2), где Y - самое большое измерение, а X - измерение, перпендикулярное ему. Мышей с опухолями более 2000 мм<sup>3</sup> или с изъязвленными опухолями умерщвляли удушением CO<sub>2</sub>.

[00365] Гуманизированных мышей hCD3/hCD28/hPSMA получали, как описано в примере 10. Лечение антителами также было аналогичным, за исключением того, что указанные антитела или биспецифичные антитела вводили в виде монотерапии или в комбинации путем внутрибрюшинной инъекции в 0, 7 и 14 день (профилактическое лечение) или на 9, 13 и 22 день (отсроченное лечение) в дозе 5 мг/кг.

#### *Анализ тканевых цитокинов ex vivo*

[00366] На 29 день после имплантации мышей CD3/CD28/PSMA с опухолями MC38/hPSMA умерщвляли удушением диоксидом углерода. Селезенки и опухоли собирали и хранили в среде на льду. Все следующие стадии проводили на льду или при 4 °С, если не

указано иное. Опухоли разрезали на мелкие кусочки и превращали фрагменты в суспензию отдельных клеток с использованием набора для диссоциации мышинных опухолей от Miltenyi в соответствии с протоколом производства (Miltenyi 130-096-730). Селезенки превращали в суспензию отдельных клеток, используя мягкую механическую диссоциацию MACS (программа для селезенки 4) и протирая через фильтр на 70 мкм с помощью резинового конца шприца на 3 мл. Клетки осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 минут. Эритроциты лизировали путем повторного суспендирования клеточного осадка в 1 мл лизирующего буфера АСК (аммоний-хлорид-калий) и инкубирования на льду в течение 5 минут. Лизирующий буфер АСК гасили буфером для FACS. Клетки осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 минут. Клеточную суспензию повторно суспендировали в 1 мл среды и высевали 0,2 мл в 96-луночные планшеты (20-400 тыс. опухолевых клеток или 50-70 тыс. клеток селезенки). Клетки инкубировали в течение ночи при 37 °С и собирали культуральный супернатант. Уровни цитокинов в супернатанте тканевой культуры измеряли с помощью набора V-Plex Proinflammatory MSD согласно протоколу производителя (Meso Scale Diagnostics K15048D-4). Количество клеток, высеванных на лунку, определяли с помощью FACS-анализа. Уровни цитокинов нормировали к количеству высеванных клеток. Калибровочные микросферы анализировали вместе с клетками для точного измерения количества клеток, используя следующий расчет:

Количество клеток = (количество введенных микросфер x количество клеток, подсчитанное посредством FACS)/количество микросфер, подсчитанное посредством FACS

*Измерение уровней цитокинов в сыворотке мышей*

[00367] Измерения уровней цитокинов в сыворотке мышей проводили, как описано ранее (пример 10).

*Анализ методом проточной цитометрии*

[00368] Для анализа методом проточной цитометрии в экспериментах *in vivo* опухоли собирали, получали суспензии отдельных клеток и лизировали эритроциты с использованием лизирующего буфера АСК (ThermoFisher Scientific). Различение живых и мертвых клеток проводили с использованием набора для окрашивания мертвых клеток Live/dead fixable blue (ThermoFisher Scientific). Образцы были получены на Symphony (BD Bioscience) и проанализированы с использованием программного обеспечения Cytobank (Cytobank, Санта-Клара, Калифорния). Анализ проводили с равным числом событий на образец. Частоту событий определяли по образцу с наименьшим числом зарегистрированных событий. Для автоматической кластеризации Т-клеток на основе специфичных маркеров использовали анализ CITRUS от Cytobank.

*Токсикологические исследования на яванских макаках*

[00369] Исследование на яванских макаках проводили, как описано ранее (пример 11).

Результаты

***Ингибирование контрольной точки PD-1 увеличивает относительное***

**отношение CD28 в иммунологическом синапсе, позволяя биспецификам TSAxCD28 заметно усиливать способность антитела к PD-1 стимулировать активацию Т-клеток *in vitro***

[00370] Чтобы проверить, могут ли костимулирующие биспецифичные агонисты дополнять ингибирование контрольной точки, иллюстративный биспецифик PSMАxCD28 согласно настоящему изобретению (bs16429D) был исследован на предмет его способности повышать эффективность блокады PD-1 при TCR/CD3-зависимой активации Т-клеток. Действительно, эффективная активация Т-клеток зависит от совместной кластеризации комплексов TCR/CD3 и CD28 в «иммунном синапсе» (ИС). Однако активационные сигналы как от TCR/CD3, так и от CD28 напрямую ингибируются фосфорилированием PD-1-Shp-2 с последующей кластеризацией PD-1/PD-L1 в синапсе (E. Hui *et al.*, T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* **355**, 1428-1433 (2017); J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, J. L. Riley, SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945-954 (2004)). Чтобы определить относительную локализацию CD28 и PD-1 в ИС, был разработан *in vitro* анализ Amnis Image Stream, как описано в примере 7, с использованием Т-клеток Jurkat, сверхэкспрессирующих PD-1, и опухолевых клеток-мишеней Raji, генетически модифицированных для сверхэкспрессии PD-L1. Флуоресцентно меченое биспецифичное антитело CD20xCD3 (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)) использовали для воспроизведения связывания пептида-ГКГС с TCR и для визуализации взаимодействий Т-клеток с клетками-мишенями, образующими ИС. Два разных флуоресцентно меченых моноклональных антитела к PD-1 (mAb к PD-1), блокатор (mAb к PD-1, REGN2810, (E. Burova *et al.*, Characterization of the Anti-PD-1 Antibody REGN2810 and Its Antitumor Activity in Human PD-1 Knock-In Mice. *Mol Cancer Ther* **16**, 861-870 (2017)) и неблокирующее антитело (NB mAb к PD-1) использовали для одновременного блокирования взаимодействия с PD-L1 и визуализации локализации PD-1. Было обнаружено, что в отсутствие экспрессии PD-L1 на клетках-мишенях и в присутствии любого из mAb к PD-1 не наблюдалось изменений в относительном количестве PD-1 или CD28 в ИС (**фиг. 14**). Однако экспрессия PD-L1 на клетках-мишенях в присутствии неблокирующего mAb к PD-1 снижала содержание CD28 в синапсе и способствовала высокому накоплению PD-1 в ИС. Напротив, в присутствии блокирующего mAb к PD-1 локализация PD-1 была значительно снижена, и относительные уровни CD28 в ИС сохранялись. Распределение PD-1 и CD28 количественно оценивали путем расчета отношения окрашивания антителами внутри ИС и за его пределами (**фиг. 15**). Эти данные показывают, что экспрессия PD-L1 на клетках-мишенях увеличивает локализацию PD-1 в ИС, снижая при этом уровень CD28. Кроме того, блокирующее mAb к PD-1 снижает относительное количество PD-1 в ИС и восстанавливает уровень CD28, тем самым увеличивая относительное отношение CD28 к PD-1.

[00371] Затем было проверено, может ли PSMAxCD28 усиливать влияние блокады PD-1 на индуцированное активацией Т-клеток уничтожение опухолевых клеток. Для этого использовали линию рака предстательной железы 22RV1. Клетки 22RV1 эндогенно экспрессируют PSMA и были генетически модифицированы для экспрессии PD-L1 (22RV1/PD-L1). Из-за отсутствия стимуляции TCR/CD3 посредством аллогенного Т-клеточного ответа использовали PSMAxCD3 (патент США № 10179819) для обеспечения первичного стимула. В совместных культурах моноклеарных клеток периферической крови человека (МНПК, содержащих Т-клетки человека) и клеток 22RV1/PD-L1, PSMAxCD3 по отдельности индуцировало примерно 40% уничтожения опухолевых клеток (**фиг. 16**, ромбы,  $EC_{50}$  составила  $8E-10$ ). Добавление mAb к PD-1 к PSMAxCD3 увеличивало уничтожение опухолевых клеток до примерно 55% (**фиг. 16**, сплошные треугольники,  $EC_{50}$  составила  $4E-10$ ). Интересно, что комбинация PSMAxCD28 и PSMAxCD3 аналогичным образом увеличивала степень уничтожения опухолевых клеток до примерно 55% с повышенной эффективностью (**фиг. 16**, сплошные кружки,  $EC_{50}$  составила  $6E-11$ ), что дает основания полагать, что PSMAxCD28 способно преодолевать опосредованное PD-1/PD-L1 ингибирование. Интересно, что тройная комбинация PSMAxCD28, mAb к PD-1 и PSMAxCD3 обеспечивала самое сильное уничтожение опухолевых клеток на уровне примерно 70%, что говорит о синергетическом эффекте этой комбинации (**фиг. 16**, сплошные квадраты,  $EC_{50}$  составила  $7E-11$ ). Как и ожидалось, ни PSMAxCD28 по отдельности, ни mAb к PD-1, ни комбинация PSMAxCD28 плюс mAb к PD-1 не индуцировали какого-либо уничтожения опухолевых клеток (**фиг. 16**, незакрашенные символы). В согласии с этим наблюдалось максимальное увеличение высвобождения IFN $\gamma$  при обработке тройной комбинацией (**фиг. 17**).

[00372] Затем было определено влияние комбинации PSMAxCD28 и mAb к PD-1 на активацию первичных Т-клеток человека *in vitro*. Для воспроизведения физиологической экспрессии PD-L1 и стимуляции TCR/CD3 использовали реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR). В однонаправленной MLR несовместимость аллогенных детерминант приводит к активации Т-клеток, что можно количественно оценить по продукции цитокинов. В данном случае Т-клетки от здоровых доноров инкубировали с клетками DU145/PSMA, генетически модифицированной линией клеток рака предстательной железы, эндогенно экспрессирующей PD-L1 и сверхэкспрессирующей PSMA, и указанными антителами (**фиг. 18**). В присутствии клеток DU145/PSMA и Т-клеток биспецифик PSMAxCD28 приводил к дозозависимому увеличению высвобождения IL-2 примерно в 3-4 раза по сравнению с изотипическим контролем IgG4 (**фиг. 18**, кружки). Аналогичным образом добавление 20 нМ mAb к PD-1 в анализ MLR также увеличивало высвобождение IL-2 примерно в 3-4 раза по сравнению с изотипическим контролем IgG4 (**фиг. 18**, треугольники). Комбинация PSMAxCD28 и 20 нМ mAb к PD-1 заметно усиливала активацию, индуцированную биспецификом PSMAxCD28, причем максимальные уровни IL-2 были увеличены примерно в 20 раз по сравнению с изотипическим контролем (**фиг. 18**, квадраты), что говорит о том, что биспецифик PSMAxCD28 в комбинации с mAb,

блокирующим PD-1, мощно и синергетически активирует Т-клетки в присутствии опухолевых клеток с эндогенными уровнями активации TCR/CD3 и ингибирования PD-L1.

[00373] В целом эти результаты продемонстрировали, что биспецифик PSMA $\times$ CD28 может эффективно повышать способность mAb к PD-1 способствовать активации Т-клеток в условиях передачи сигналов TCR/CD3 (управляемой CD3-биспецификом или аллогенным ответом), что приводит к увеличению высвобождения цитокинов и уничтожению опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA и PD-L1, *in vitro*.

***Сверхэкспрессия естественного лиганда CD28 на опухолевых клетках действует синергетически с лечением mAb к PD-1, индуцируя опосредованный CD8 Т-клетками длительный противоопухолевый иммунитет in vivo***

[00374] Чтобы определить, может ли взаимодействие CD28 с его естественным лигандом(ами) усиливать противоопухолевую эффективность mAb к PD-1 *in vivo*, опухолевые клетки MC38 были генетически модифицированы для сверхэкспрессии CD86, одного из костимулирующих лигандов для CD28 (данные не показаны). Комбинация клеток MC38/CD86 и лечения mAb к PD-1 значительно ингибировала рост опухоли (**фиг. 19А**), что привело к полной регрессии опухоли, связанной с устойчивым преимуществом в части выживаемости (**фиг. 19В**) по сравнению с клетками MC38 отрицательного контроля, трансфицированными контрольным пустым вектором (MC38/EV). Истощение CD8<sup>+</sup> Т-клеток во время курса лечения привело к полному исчезновению противоопухолевой эффективности, достигнутой при комбинировании терапии mAb к PD-1 с клетками MC38/CD86, что говорит о необходимости CD8<sup>+</sup> Т-клеток (**фиг. 19С**). Следует отметить, что мыши без опухолей, которым изначально имплантировали клетки MC38/CD86 и вводили mAb к PD-1, отторгли вторую родительскую опухоль MC38, имплантированную более чем через 60 дней после имплантации первичной опухоли, что указывает на наличие ответа Т-клеток памяти (**фиг. 19D**). Следовательно, эти данные демонстрируют, что синергетический эффект конститутивной экспрессии лиганда CD28 и терапии антителом к PD-1 может привести к длительному CD8-зависимому противоопухолевому иммунитету *in vivo*.

***PSMA $\times$ CD28 действует синергетически с лечением mAb к PD-1 в отношении индукции противоопухолевого иммунитета в модели сингенной опухоли***

[00375] Результаты, описанные выше, были затем расширены, чтобы продемонстрировать противоопухолевую эффективность лечения с использованием биспецифичного антитела к TSA $\times$ CD28 по отдельности или в комбинации с mAb к PD-1 в моделях сингенных опухолей. Используя модель сформировавшейся сингенной опухоли MC38 у C57BL6, как описано в настоящем документе, ген hPSMA (pLVX.EF1a.hPSMA) генетически вводили в клетки MC38 для создания опухолеспецифичного антигена MC38/hPSMA, как описано в настоящем документе. Чтобы избежать вероятности того, что мыши спонтанно отторгнут эти во всех прочих аспектах сингенные опухоли, экспрессирующие введенный опухолевый антиген человека, у этих мышей генетически гуманизировали PSMA. Кроме того, гены CD3 $\gamma$ - $\delta$ - $\epsilon$  и CD28 также гуманизировали с

использованием технологии VelociGene, как описано ранее (D. M. Valenzuela *et al.*, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 652-659 (2003); W. T. Poueymirou *et al.*, F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* **25**, 91-99 (2007)), так чтобы биспецифики распознавали Т-клетки хозяина (посредством hCD3 или hCD28), а также опухолевые антигены человека как в здоровых тканях, так и в опухолях (например, hPSMA), моделируя реальную клиническую ситуацию (Y. Kinoshita *et al.*, Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg* **30**, 628-636 (2006)). В этой модели комбинация биспецифика PSMAxCD28 и mAb к PD-1 обеспечила наилучший контроль роста опухоли, что выражалось в устойчивом преимуществе в выживаемости.

*Немедленное лечение комбинацией анти-CD28 X анти-PSMA и антитела к PD1 синергетически ингибирует рост опухоли*

[00376] В исследовании немедленного лечения анти-CD28 x анти-PSMA, антитело к PD1 или крысиный изотипический контроль IgG2a вводили в виде монотерапии или в комбинации путем внутрибрюшинной инъекции в 0, 7 и 14 день в дозе 5 мг/кг. Динамику роста опухоли контролировали, используя штангенциркуль для измерения диаметра X и Y. Рассчитывали объем опухоли ( $X*Y*(X/2)$ ). Мышей умерщвляли, когда опухоли вырастали до размера, превышающего 2000 мм<sup>3</sup>.

[00377] Как показано на **фиг. 20А-20Е**, антитела анти-CD28 x анти-PSMA подавляли рост опухоли и увеличивали выживаемость у мышей при применении по отдельности, но также действовали синергетически с антителами к PD-1, способствуя отторжению опухоли и увеличивая выживаемость еще больше, чем при применении в отсутствие антитела к PD-1.

*Лечение комбинацией CD28xPSMA и PD1 индуцирует долговременный противоопухолевый иммунитет к повторной имплантации опухоли*

[00378] Кроме того, мыши без опухолей, у которых осуществляли имплантацию и вводили им комбинацию биспецифика PSMAxCD28 и mAb к PD-1, отторгали вторую линию родительских опухолевых клеток MC38, которая была имплантирована более чем через 60 дней после первичной имплантации опухоли, демонстрируя формирование иммунологической памяти (**фиг. 21А**), что согласуется с наблюдениями, описанными в настоящем документе. Эти результаты дают основания полагать, что эндогенный антиген-специфичный сигнал TCR (сигнал 1) формируется комплексом пептид-ГКГС в направлении имплантированных опухолевых клеток MC38/PSMA. Было показано, что опухолевые клетки MC38 экспрессируют высокие уровни реактивированных эндогенных ретровирусных белков, таких как p15E, и что внутриопухолевые Т-клетки у мышей C57BL6 отвечают на этот антиген p15E (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo

antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). В согласии с этим открытием было обнаружено, что комбинированная терапия PSMAxCD28 и mAb к PD-1 индуцировала реактивность периферических Т-клеток в отношении по меньшей мере одного эндогенного антигена P15E, что подтверждает формирование противоопухолевой иммунологической памяти (**фиг. 21B**). Примечательно, что в аналогичных экспериментах, где лечение PSMAxCD28 в комбинации с PSMAxCD3 индуцировало отторжение опухоли MC38/hPSMA, эти мыши без опухолей не смогли отторгнуть повторные опухоли (**фиг. 21C**). В целом эти данные демонстрируют, что CD28-биспецифики действуют синергетически с mAb к PD-1 в этой модели сингенной опухоли, экспрессирующей PSMA, и могут усиливать эндогенные TCR/CD3-зависимые Т-клеточные ответы.

*Терапевтическое лечение комбинацией анти-CD28 x анти-PSMA и антитела к PD1 синергетически ингибирует рост опухоли*

[00379] Аналогичным образом, в протоколе отсроченного лечения комбинация PSMAxCD28 и mAb к PD-1 через 10 дней после имплантации ингибировала рост сформировавшихся опухолей MC38/hPSMA (**фиг. 22A**), а также приводила к значительному увеличению выживаемости (**фиг. 22C**) и уменьшению объемов опухолей (**фиг. 22D**). Интересно, что комбинированная терапия, нацеленная на опухоль, селективно повышала уровни внутриопухолевых цитокинов, как показано на примере IFN $\gamma$  (**фиг. 22B**). У этих же мышей не наблюдалось индукции селезеночных или системных цитокинов (**фиг. 23A** и **23B**). Кроме того, профилирование экспрессии маркеров активации Т-клеток показало, что внутриопухолевая экспрессия PD-1 увеличивалась после лечения PSMAxCD28 (**фиг. 24**), что говорит в пользу данного комбинированного лечения. Чтобы дополнительно охарактеризовать подмножества отвечающих Т-клеток после комбинированного лечения, провели профилирование опухоль-инфильтрирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток на 17 день после имплантации опухоли с помощью высокоразмерной проточной цитометрии. Для независимой стратификации статистически значимо различающихся кластеров Т-клеток использовали CITRUS (cluster identification, characterization, and regression - идентификация, определение характеристик и регрессионный анализ кластеров). Важно отметить, что, как было установлено, блокада PD-1 вызвала экспансию эффекторных (CD44<sup>выс</sup>CD62L<sup>низк</sup>) CD8<sup>+</sup> Т-клеток (кластер C1), экспрессирующих высокий уровень маркеров активации/истощения (PD-1, TIM3, LAG3, Ki67) (**фиг. 25**). Однако только комбинированное лечение было способно стимулировать экспансию внутриопухолевых CD8<sup>+</sup> Т-клеток (кластер C2) с фенотипом, подобным клеткам памяти (высокий Tcf1, EOMES, CD62L, средний CD122 и CD127) и менее истощенным фенотипом (низкий PD-1, LAG3, TIM3, CD38, KLRG1, более высокий CD5) (**фиг. 25**) (M. Philip *et al.*, Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452-456 (2017)). Эти данные демонстрируют, что комбинированная терапия биспецификом PSMAxCD28 и антителом к PD-1 вызывает устойчивый противоопухолевый иммунитет, связанный с внутриопухолевой активацией Т-клеток с фенотипом, подобным клеткам памяти, и преимуществом в выживаемости.

***TSAxCD28 по отдельности или в комбинации с терапией mAb к PD-1 не индуцирует системную активацию Т-клеток по сравнению с суперагонистом к CD28 у яванских макаков***

[00380] Данные ранее проведенного клинического исследования показали, что двухвалентные CD28-активирующие антитела, названные «суперагонистами к CD28» (CD28-SA), активировали широкий спектр Т-клеток и привели к выраженной токсичности, связанной с синдромом высвобождения цитокинов (CRS), в группе здоровых добровольцев (G. Suntharalingam *et al.*, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)). Для оценки переносимости биспецификов TSAxCD28 по отдельности или возможности синергетического фармакологического действия в комбинации с mAb к PD-1 были проведены поисковые исследования на генетически модифицированных трижды гуманизированных мышах и яванских макаках. Три обезьяны на группу лечения получали разовую дозу (10 мг/кг) PSMAxCD28 по отдельности или в комбинации с mAb к PD-1 (REGN2810) (10 мг/кг) путем внутривенной инфузии (группы комбинированного лечения получали последовательные инфузии) (**таблица 20, фиг. 26А-26С и 27**).

[00381] Кроме того, три обезьяны на группу получили разовую дозу (0,1 мг/кг) биспецифичного антитела к PSMAxCD3 и разовую дозу (10 мг/кг) антитела-суперагониста к CD28, как описано в настоящем документе (**таблица 20, фиг. 26А-26С и 27**). Оценка токсичности основывалась на клинических наблюдениях, качественных показателях потребления корма, массе тела, показателях жизненно важных функций (температура тела, частота сердечных сокращений, пульсоксиметрия и частота дыхательных движений), лабораторной диагностике и патологической анатомии по завершении эксперимента. Были собраны образцы крови для анализа на цитокины и иммунофенотипирования методом FACS. PSMAxCD28 по отдельности или в комбинации с PD-1 хорошо переносилось, и все животные выжили в течение всего периода исследования. Клинических наблюдений, связанных с исследуемым препаратом, не наблюдалось (данные не показаны). Не было обнаружено ни изменений массы органов, ни каких-либо макроскопических изменений при вскрытии после умерщвления (данные не показаны). Кроме того, не наблюдалось значительного высвобождения цитокинов, маргинации или активации Т-клеток (**таблица 23, фиг. 26А-26С**). Напротив, значительное высвобождение цитокинов, маргинация лимфоцитов и активация Т-клеток наблюдались у обезьян, которым вводили только «суперагонист» CD28 (**фиг. 29А и 29В**). Обильная инфильтрация иммунными клетками наблюдалась в почках, головном мозге и семенных пузырьках животных, получивших суперагонист CD28. Напротив, у животных, которым вводили PSMAxCD28 по отдельности или в комбинации с PD-1, никаких значимых гистологических изменений, связанных с лечением, не наблюдалось (данные не показаны).

**Таблица 23. Никаких значимых клинических наблюдений или высвобождения цитокинов не наблюдалось при применении анти-PSMAxCD28 по отдельности или в комбинации с антителом к PD-1 в рамках поискового исследования токсичности разовой дозы на обезьянах**

Молекула	Описание	Доза (мг/кг)	1 день - клинические наблюдения	Любые наблюдения	Абсолютное кол-во Т-клеток (ЕЗ/мкл)		Пролиферирующие Ki67+ Т-клетки (ЕЗ/мкл)		Активированные Т-клетки (ЕЗ/мкл) -ICOS		CRP (мг/дл)	Цитокины плазмы через 5 часов после введения дозы (пг/мл)															
					Предв-й тест	5 ч	Предв-й тест	96 ч	Предв-й тест	96 ч		24 ч	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-5							
bs15780 D	анти-PSMAxCD3	0,1		Выгибание	4,1	0,1	0,2	1,21	0,4	0,8	13,6	4449	53	287	15	BL	BL	BL	BL								
					5	1	4		2	2										1	8	9	Q*	Q	Q	Q	
					7,4	0,1	0,8	1,69	0,4	0,6	14,9	1123	39	221	18	BL	35	BL	15	9	10	40	00	Q	7	Q	2
					1	5	8		0	4																	
					5,6	0,0	0,4	3,87	0,6	3,7	15,4	1052	77	247	11	BL	BL	BL	BL								
					8	1	2	8	5	9										6	84	76	Q	Q	Q	Q	
bs16429	анти-	1	-	-	6,5	7,2	0,6	0,41	0,3	0,3	0,5	BLQ	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL								

D	PSMAxCD 28		-	-	8 2 4,9 5,0 1 9	2 0,4 2	0,23	3 2 0,2 0,1 6 7	0,5	BLQ	Q Q Q Q Q Q Q BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q
			-	-	4,5 4,0 0 4	0,6 3	0,39	0,5 0,4 1 8	1,1	BLQ	BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q
bs16429 D	анти- PSMAxCD 28	10	-	-	6,0 5,7 3 3 4,6 4,5 4 3	0,3 3 0,3 8	0,44 0,60	0,3 0,2 3 2 0,5 0,5 8 0	0,2 0,2	BLQ BLQ	BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q
			-	-	10, 7,1 06 6	0,8 8	0,49	0,8 0,4 4 8	1,3	BLQ	BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q
REGN23 29 (TeGenero)	суперагон ист к CD28	10	-	-	7,0 0,2 2 6 7,0 0,1 6 9	0,6 0 0,7 9	2,57 1,55	0,5 1,9 1 4 0,4 1,1 3 1	15,4 15	764 2907	BL 336 BL BL BL BL 11 Q 4 Q Q Q Q 69 10 171 33 BL 23 BL 61 95 55 3 Q 8 Q 5
			-	-	11, 0,6 87 6	1,1 3	3,61	0,4 2,0 8 9	15,3	5226	53 791 15 52 34 19 24 8 09 163 2 2 8
bs16429 D+REGN 2810	анти- PSMAxCD 28 +PD-1	10+10	-	-	3,7 1,9 6 0 3,6 2,0 6 7	0,3 8 0,5 4	0,37 0,52	0,3 0,2 4 8 0,2 0,2 2 0	10,8 1	BLQ BLQ	BL BL BL BL BL BL BL Q Q Q Q Q Q Q BL BL BL 195 BL 32 BL Q Q Q Q Q 3 Q
			-	-	3,5 1,3	0,3	0,40	0,1 0,1	11,9	BLQ	BL BL BL BL BL BL BL

				4	4	9		2	0		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q			
bs16431 D+REGN 2810	анти- PSMA $\alpha$ CD 28 +PD-1	10+10	-	-	3,6	4,2	0,3	0,42	0,2	0,3	5,1	BLQ	BL	BL	BL	BL	BL	33	BL	
					3	3	6		4	8			Q	Q	Q	Q	Q	Q	3	Q
			-	-	3,5	1,9	0,3	0,19	0,1	0,1	2,9	BLQ	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL
					3	0	5		3	5			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
-	-	4,1	3,1	0,4	0,32	0,2	0,3	0,2	BLQ	BL	BL	BL		BL	32	BL				
		6	6	2		6	3			Q	Q	Q	187	Q	3	Q				
mAb1015 4P3	EGFRVIII Ab		-	-	6,2	5,6	0,6	0,58	0,3	0,3	0,8	BLQ	BL	BL	BL		BL	33	BL	
					1	2	0		2	9			Q	Q	Q	151	Q	5	Q	
			-	-	7,2	7,7	0,8	0,77	0,3	0,4	11	BLQ	BL	BL	BL		BL	37	BL	
					2	2	4		9	1			Q	Q	Q	267	Q	8	Q	
-	-	3,5	4,6	0,5	0,75	0,2	0,4	0,2	BLQ	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL				
		5	1	1		6	4			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q				

\*BLQ: ниже нижнего предела количественного определения

[00382] В согласии с приведенными выше исследованиями у яванских макаков, у имеющих опухоли или не имеющих опухолей наивных трижды гуманизированных мышей (hCD3/hCD28/hPSMA), которым вводили PSMAxCD28, по отдельности или в комбинации с PD-1, не наблюдалось повышения уровней цитокинов (**фиг. 27** и **фиг. 29А** и **29В**). Напротив, введение суперагониста к CD28 индуцировало значительное повышение уровней IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4 и IL-5 через 4 часа после введения дозы (**фиг. 27** и **фиг. 29А** и **29В**). В согласии с результатами, описанными выше, ранее было показано, что биспецифик TSAxCD28 (а также родительские двухвалентные антитела к CD28, не обладающие свойствами суперагонистов, использованные для создания этих биспецификов) не индуцирует пролиферацию Т-клеток человека в рекомендованном FDA анализе *in vitro* с нанесением сухим и мокрым способом (R. Stebbings, D. Eastwood, S. Poole, R. Thorpe, After TGN1412: recent developments in cytokine release assays. *J Immunotoxicol* **10**, 75-82 (2013)) по сравнению с сильной пролиферацией, индуцированной CD28-SA (данные не показаны). В целом эти данные дают основания полагать, что биспецифики к TSAxCD28 в значительной степени лишены иммуногенности.

[00383] Кроме того, как было описано ранее (пример 10, **фиг. 28**), лечение анти-PSMAxCD28, по отдельности или в комбинации с антителом к PD1, не повышало сывороточные уровни цитокинов у мышей с опухолями, тогда как лечение анти-PSMAxCD3, по отдельности или в комбинации с антителом к PD1, повышало сывороточные уровни цитокинов у мышей с опухолями.

#### *Обсуждение*

[00384] В настоящем документе предложен и проверен новый вид иммунотерапии, нацеленной на опухоли, в котором используются биспецифики TSAxCD28 в комбинации с блокирующим PD-1 моноклональным антителом, где указанная иммунотерапия индуцирует долгосрочный противоопухолевый иммунитет и способствует устойчивой внутриопухолевой активации Т-клеток в моделях опухолей на животных. Токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышках и на яванских макаках продемонстрировали, что эти биспецифики не проявляют токсичности сами по себе или в комбинации с моноклональным антителом к PD-1, что дает основания полагать, что этот терапевтический подход может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной, специфичной и синергической противоопухолевой активностью.

[00385] Известно, что ингибирование контрольных точек с помощью блокирующего PD-1 моноклонального антитела снимает ограничения по активации Т-клеток, однако эффективности этих подходов в качестве монотерапии часто недостаточно для достижения элиминации опухоли и длительного противоопухолевого ответа при многих видах рака. В настоящее время изучаются несколько подходов к улучшению частоты ответа на ингибирование PD-1. Так, идентификация биомаркеров для прогнозирования восприимчивости к mAb к PD-1 (R. Cristescu *et al.*, Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* **362**, (2018)), не нацеленные на опухоли

комбинированные терапии с применением ингибирования PD-1 вместе с агонистическими антителами, запускающими костимулирующие рецепторы для улучшения активации Т-клеток, или с химиотерапией или радиационной терапией, в настоящее время проходят доклинические и клинические исследования (S. Hu-Lieskovan, A. Ribas, New Combination Strategies Using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 Checkpoint Inhibitors as a Backbone. *Cancer J* **23**, 10-22 (2017); Y. K. Chae *et al.*, Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer* **6**, 39 (2018); P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* **283**, 110-120 (2018)). Однако проблема заключается в том, что многие из этих комбинаций часто основываются на доступности уже существующих лекарственных средств и апостериорных суждениях о рациональности комбинирования видов терапии, а не на истинном основании на гипотезах подходе, что в некоторых случаях приводило к наихудшим результатам для пациента (M. J. Ahn, J. M. Sun, S. H. Lee, J. S. Ahn, K. Park, EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* **16**, 465-469 (2017)). Очевидно, что ингибирование контрольной точки и повторная активация иммунной системы обеспечивает возможность долгосрочной ремиссии у целого ряда пациентов (J. S. Weber *et al.*, Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375-384 (2015); S. L. Topalian *et al.*, Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**, 1020-1030 (2014); M. A. Postow, M. K. Callahan, J. D. Wolchok, Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974-1982 (2015); M. R. Migden *et al.*, PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **379**, 341-351 (2018)), поэтому необходимы варианты дальнейшего улучшения или повышения активности Т-клеток для обеспечения более длительного ответа. В настоящем документе для улучшения противоопухолевой эффективности mAb к PD-1 была предложена концепция применения биспецифика TSAxCD28 для усиления активации и передачи сигналов Т-клетками. Так, эта новая комбинированная иммунотерапия была проверена с использованием опухолевой мишени (например, PSMA), и было продемонстрировано, что костимулирующие биспецифичные антитела к CD28 действуют синергетически с mAb к PD-1, не только генерируя устойчивую активацию Т-клеток, но также обеспечивая длительные противоопухолевые ответы без системной токсичности. Следовательно, эта комбинированная терапия, нацеленная на опухоли, может обеспечить значительное преимущество перед нецелевыми подходами, описанными ранее. Применение CD28-биспецифичных антител, которые не активируют CD28 напрямую, кроме тех случаев, когда он кластеризован на поверхности опухолевых клеток, дает возможность обеспечивать костимуляцию только в месте опухоли, избегая системной токсичности обычных CD28-активирующих антител (G. Suntharalingam *et al.*, Cytokine

storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)), которая часто наблюдается в случае комбинации CTLA-4 и блокады PD-1 (J. Larkin *et al.*, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **373**, 23-34 (2015); D. B. Johnson *et al.*, Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **375**, 1749-1755 (2016); M. H. Pollack *et al.*, Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD1 in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **29**, 250-255 (2018)) или других костимулирующих агонистических двухвалентных антител (N. H. Segal *et al.*, Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res* **23**, 1929-1936 (2017)). Токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах, а также на яванских макаках, продемонстрировали, что эти биспецифики не проявляют токсичности при применении в качестве монотерапии или в комбинации с mAb к PD-1. Профиль безопасности вместе с повышением противоопухолевой эффективности посредством биспецифичных антител к PSMAxCD28 согласно изобретению с mAb к PD-1 в сингенных моделях дает основания полагать, что этот терапевтический метод является надежным и может иметь более широкое применение в качестве нового класса иммунотерапевтической комбинации.

[00386] Для усиления опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток разрабатываются подходы, нацеленные на опухоль (E. Dahlen, N. Veitonmaki, P. Norlen, Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Ther Adv Vaccines Immunother* **6**, 3-17 (2018)). Так, биспецифичные антитела на основе CD3 представляют собой новый класс антител, которые могут эффективно запускать активацию Т-клеток, связывая Т-клетку с опухолевой клеткой и активируя TCR/CD3 (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)), тем самым имитируя обычный «сигнал 1». Однако, несмотря на многообещающую клиническую эффективность, CD3-биспецифики могут быть связаны с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) из-за прямой активации Т-клеток и отсутствия специфичности исключительно к опухоли (S. L. Maude, D. Barrett, D. T. Teachey, S. A. Grupp, Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J* **20**, 119-122 (2014)). В настоящем изобретении было впервые продемонстрировано, что комбинированная терапия биспецификом TSAxCD28 и mAb к PD-1 индуцирует опухолеспецифичную активацию Т-клеток, связанную с долговременным анамнестическим ответом, на модели опухоли у иммунокомпетентных мышей. Биспецифичные антитела к TSAxCD28 практически не проявляют активности в отсутствие «сигнала 1», а блокада PD-1 зависит от ответа специфичных к эндогенному антигену Т-клеток на опухолевые пептиды (W. Hugo *et al.*, Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35-44 (2016); N. A. Rizvi *et al.*, Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128 (2015); J. M. Mehnert *et al.*, Immune activation and response to pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer. *J Clin Invest* **126**, 2334-2340

(2016); D. T. Le *et al.*, Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409-413 (2017)). Следовательно, «сигнал 1», обеспечиваемый эндогенными опухолевыми антигенами, важен для комбинированного лечения PSMAxCD28 и mAb к PD-1. Это отличается от CD3-биспецификов, которые активируют Т-клетки независимо от специфичности их TCR и, следовательно, не могут генерировать долговременный опухолеспецифичный иммунитет. Действительно, было обнаружено, что, хотя при комбинированном лечении PSMAxCD3 и PSMAxCD28 достигается высокая противоопухолевая эффективность, оно не генерирует сильного анамнестического ответа. Кроме того, было показано, что опухолевые клетки MC38 экспрессируют высокие уровни реактивированных эндогенных ретровирусных пептидов, таких как p15E, и мыши C57BL6 могут генерировать эндогенные Т-клетки, которые распознают этот неоэпитоп и отвечают на него (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). В модели MC38, описанной в настоящем документе, было продемонстрировано, что комбинированная терапия PSMAxCD28 и mAb к PD-1 увеличивала количество Т-клеток, отвечающих на этот неоантиген p15E. Кроме того, в настоящем изобретении посредством обширного профилирования опухолеинфильтрирующих Т-клеток было обнаружено, что комбинация PSMAxCD28 и mAb к PD-1 обеспечивает менее дисфункциональные CD8 Т-клетки и способствует сильному внутриопухолевому фенотипу Т-клеток памяти. Таким образом, CD28-биспецифики вместе с блокадой PD-1 могут усиливать эндогенные TCR/CD3-зависимые Т-клеточные ответы, вызывая длительные противоопухолевые ответы.

[00387] Приведенные в настоящем документе данные демонстрируют, что PD-1 накапливается в иммунном синапсе, когда PD-L1 экспрессируется клетками-мишенями, и его накопление связано с уменьшением CD28 в синапсе, что дает основания полагать, что PD-1 может ингибировать Т-клетки, предотвращая локализацию CD28 в синапсе. Кроме того, в настоящем изобретении было обнаружено, что блокада PD-1 предотвращала синаптическую локализацию PD-1, в то время как накопление CD28 в синапсе была повышено, что позволило биспецифику TSAxCD28 заметно усилить способность mAb к PD-1 стимулировать активацию Т-клеток. Это может быть одним из механизмов, посредством которого блокирующее PD-1 антитело способствует активации Т-клеток. В целом, визуализация локализации PD-1 и CD28 в иммунологическом синапсе после взаимодействия PD-1-PD-L1 и/или ингибирования PD-1 позволяет лучше понять влияние блокады PD-1 на активацию Т-клеток, а также синергетическое взаимодействие между TSAxCD28 и mAb к PD-1 на уровне иммунного синапса.

[00388] Хотя mAb к PD-1 представляют собой важный новый класс иммунотерапии, во многих случаях, несомненно, будет важна дальнейшая оптимизация противоопухолевой активности. Подобно тому, как в CAR-Т-клеточных подходах использовали химерные

рецепторы, которые искусственно активируют как «сигнал 1», так и «сигнал 2», чтобы улучшить их противоопухолевую активность (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); A. I. Salter *et al.*, Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* **11**, (2018)), в данном изобретении показано потенциальное преимущество комбинирования ингибирования PD-1 с CD28-биспецификами (которые обеспечивают «сигнал 2») для усиления противоопухолевой активности. Этот подход обладает несколькими практическими преимуществами по сравнению с CAR-T-клеточной терапией - то, что он не требует трудоемкой подготовки клеточной терапии, которая должна быть индивидуально адаптирована для каждого пациента, а также не требует предварительного прохождения пациентами «лимфодеплеции» путем токсической химиотерапии, часто связанной с нежелательными явлениями, вследствие чего они не могут получать такую клеточную терапию (C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)). Этот биспецифичный подход обеспечивает возможности для повышения эффективности, а также повышения безопасности за счет специфичности его действия. В совокупности эти данные дают основания полагать, что комбинирование биспецификов на основе CD28 с успешно прошедшими клинические исследования mAb к PD-1, такими как цемиплимаб, может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной и синергической противоопухолевой активностью.

[00389] Настоящее изобретение не подлежит ограничению в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых графических материалов. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:
  - a) первый антигенсвязывающий домен (D1), который связывает CD28 человека с  $K_D$  менее чем приблизительно  $10^{-6}$  М при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $25^\circ$  С; и
  - b) второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфично связывает простатоспецифичный мембранный антиген (PSMA) человека на опухолевой клетке-мишени с  $K_D$  менее чем приблизительно  $10^{-9}$  М при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $25^\circ$  С.
2. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью Т-клеток человека с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно  $10^{-6}$  М при измерении с помощью анализа связывания методом FACS *in vitro*.
3. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью Т-клеток яванского макака с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно  $10^{-7}$  М при измерении с помощью анализа связывания методом FACS *in vitro*.
4. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью линий клеток, экспрессирующих PSMA, с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно  $10^{-8}$  М при измерении с помощью анализа связывания методом FACS *in vitro*.
5. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула демонстрирует костимулирующее действие при применении в сочетании с биспецифичным антителом к PSMA X CD3 и тестировании на клетках-мишенях, экспрессирующих PSMA.
6. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 5, где костимулирующее действие проявляется в одном или более из следующего: (a) способности активировать и направлять Т-клетки человека на уничтожение клетки-мишени, экспрессирующей PSMA; (b) способности повышающе регулировать PD-1 на Т-клетках; (c) способности увеличивать высвобождение цитокинов IFN-гамма и TNF из МНПК; (d) способности истощать опухолевые клетки; или (f) способности повышать элиминацию опухоли.
7. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 6, где костимулирующее действие дополнительно проявляется в одном или более из следующего: (g) активации активности NF $\kappa$ B в репортерном анализе с Т-клетками/АПК на основе люциферазы; или (h) измерении продукции цитокина IL-2 с использованием функционального анализа в первичных CD4<sup>+</sup> Т-клетках/АПК.
8. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-7, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула специфично связывается с клетками, сконструированными для экспрессии CD28, с  $EC_{50}$  от приблизительно 5,0 нМ до

приблизительно 10 нМ при измерении с помощью платформы для определения электрохемилюминесценции.

9. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-7, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула специфично связывается с линией клеток эпителиальной карциномы предстательной железы человека с  $EC_{50}$  от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 5,0 нМ при измерении с помощью платформы для определения электрохемилюминесценции.

10. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-9, где опухолевая клетка-мишень представляет собой клетку рака предстательной железы.

11. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-10, где первый антигенсвязывающий домен (D1) содержит:

а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 34 и 58; и

б) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

12. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 11, содержащая:

а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36 и 60, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 38 и 62, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 40 и 64.

13. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 12, содержащая:

а) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

14. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 11, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14, 16; 36, 38, 40; 60, 62 и 64, и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24; 44, 46, 48; и 68, 70, 72.

15. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 11, где первый

антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/ LCVR, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18; 34/42 и 58/66.

16. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-15, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) три HCDR, содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 26 и 50; и

б) три LCDR, содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

17. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 16, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 28 и 52;

б) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 30 и 54, и

с) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 32 и 56.

18. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 17, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

19. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 18, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 6, 8; 28, 30, 32; и 52, 54, 56, и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24; 44, 46, 48; и 68, 70, 72.

20. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, содержащий CDR HCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12, 14, 16, и CDR LCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24; и

б) второй антигенсвязывающий домен, содержащий CDR HCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 6, 8, и CDR LCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24.

21. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36, 38, 40, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46, 48; и

b) второй антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30, 32, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46, 48.

22. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, содержащая:

a) первый антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 60, 62, 64, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72; и

b) второй антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 52, 54, 56, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72.

23. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, содержащая:

a) первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/ LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/18; и

b) второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/ LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/18.

24. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, где

a) первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34/42; и

b) второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26/42.

25. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-19, где

a) первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58/66; и

b) второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50/66.

26. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с PSMA или связывается с тем же эпитопом на PSMA, что и референсное антитело, где указанное референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/18, 34/42 или 58/66, и второй антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/18, 26/42 или 50/66.

27. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с CD28 человека или связывается с тем же эпитопом на CD28

человнка, что и референсное антитело, где указанное референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/18, 34/42 или 58/66, и второй антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/18, 26/42 и 50/66.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-27 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

29. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифичное антитело по любому из пп. 1-27.

30. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 29.

31. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 30.

32. Способ ингибирования роста опухоли из клеток предстательной железы у субъекта, включающий введение указанному субъекту выделенного биспецифичного антитела по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 28.

33. Способ по п. 32, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

34. Способ по п. 33, где второй терапевтический агент включает противоопухолевый агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

35. Способ лечения пациента, страдающего раком предстательной железы или другим злокачественным новообразованием из клеток, экспрессирующих PSMA, включающий введение указанному субъекту выделенного биспецифичного антитела по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 28.

36. Способ по п. 35, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

37. Способ по п. 36, где второй терапевтический агент включает противоопухолевый агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

38. Способ по п. 33 или п. 36, где второй терапевтический агент представляет собой другое биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывается с тем же опухолевым антигеном-мишенью, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 на Т-клетках.

39. Способ по любому из пп. 33-38, где второй терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольной точки.

40. Способ по п. 39, где ингибитор контрольной точки нацелен на PD-1 или CTLA4.

41. Способ по п. 40, где ингибитор PD-1 выбран из группы, состоящей из пембролизумаба (Keytruda), ниволумаба (Opdivo), атезолизумаба (Tencetriq) и

цемиплимаба.

42. Способ по п. 40, где ингибитор CTLA4 представляет собой ипилимумаб.

43. Способ по любому из пп. 32-42, где способ приводит к активации Т-клеток и направлению их на уничтожение опухолевой клетки-мишени без индукции цитокинового шторма.

44. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-27, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток предстательной железы человека.

45. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает PSMA человека.

46. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 45, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с экспрессирующими CD28 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$  от  $1 \times 10^{-12}$  М до  $1 \times 10^{-6}$  М.

47. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 46, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с экспрессирующими CD28 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$  от  $1 \times 10^{-9}$  до  $1 \times 10^{-6}$ .

48. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-47, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки человека, экспрессирующие CD28 человека, и клетки яванского макака, экспрессирующие CD28 яванского макака.

49. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-47, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула индуцирует пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) человека и яванского макака *in vitro*.

50. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-47, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула индуцирует высвобождение цитокинов и повышающую регуляцию CD25 в цельной крови человека.

51. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-47, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток предстательной железы человека.

52. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 34 и 58, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

53. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий PSMA человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 2, 26 и 50, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

54. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36 и 60; где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 38 и 62; где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 40 и 64, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

55. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий PSMA человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 28 и 52; где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 30 и 54; где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 32 и 56, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

56. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), и где второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий PSMA человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2

и LCDR3); где первый антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36 и 60; где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 38 и 62; где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 40 и 64, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72; и где второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 28 и 52, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 30 и 54, где HCDR3 содержит SEQ ID NO: 8, 32 и 56, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

57. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36 и 60; где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 38 и 62; где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 40 и 64, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

58. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 34 и 58, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

59. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с PSMA человека с

референсным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 28 и 52; где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 30 и 54; где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 32 и 56, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 44 и 68, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 46 и 70, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 48 и 72.

60. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с PSMA человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) 2, 26 и 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

61. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 45-51, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 34 и 58, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66, и где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с PSMA человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 26 и 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 42 и 66.

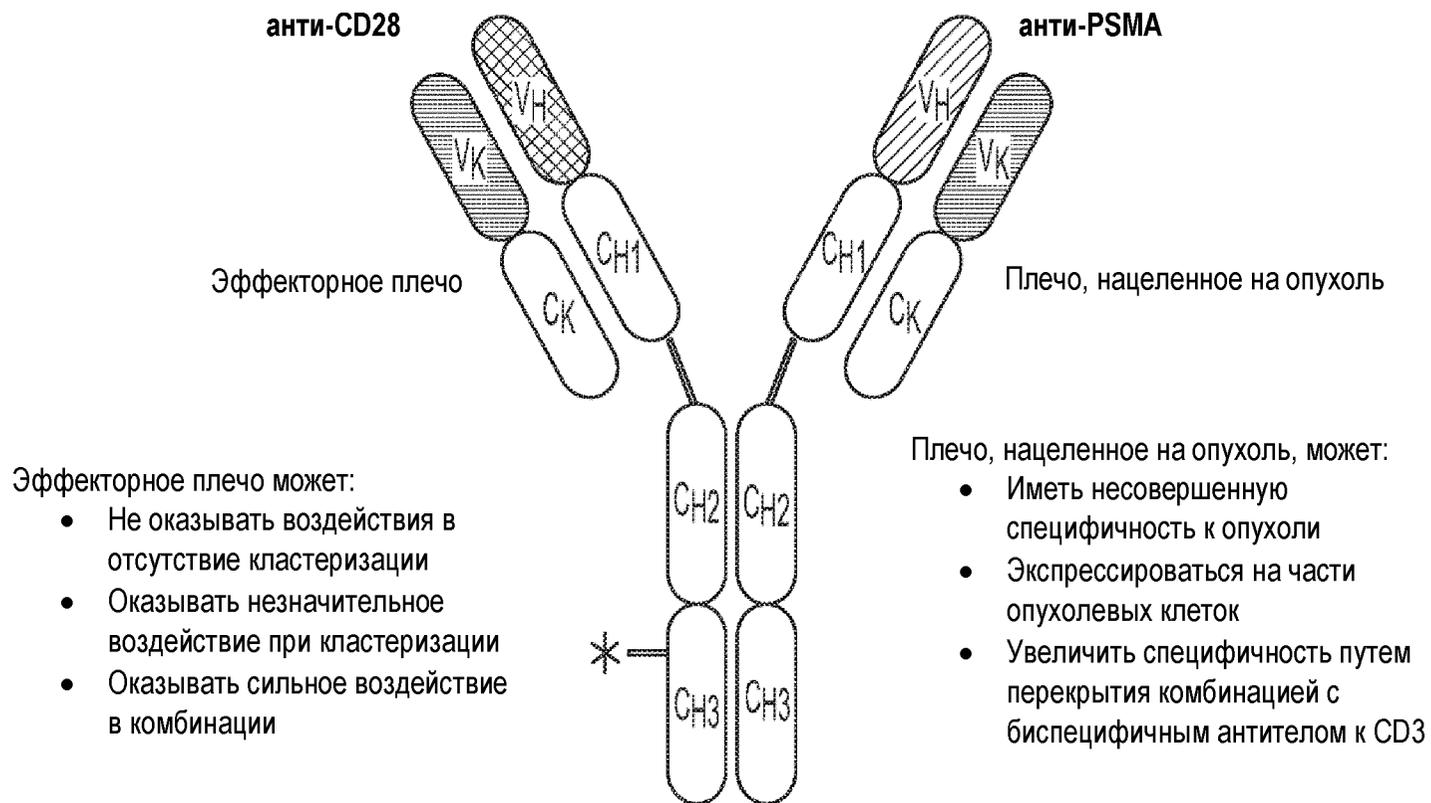
62. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 45-61 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

63. Способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п. 62.

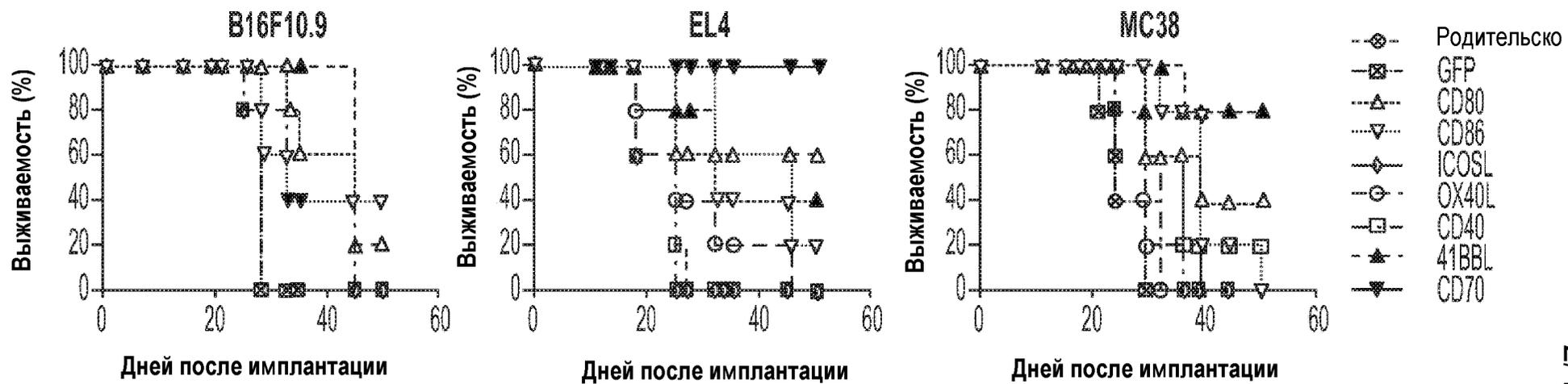
64. Способ по любому из пп. 39-41, дополнительно включающий введение второго биспецифичного антитела, где указанное второе биспецифичное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с PSMA человека.

По доверенности

ПРИМЕР КОСТИМУЛИРУЮЩЕГО БИСПЕЦИФИЧНОГО АНТИТЕЛА анти-CD28 X анти-PSMA ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

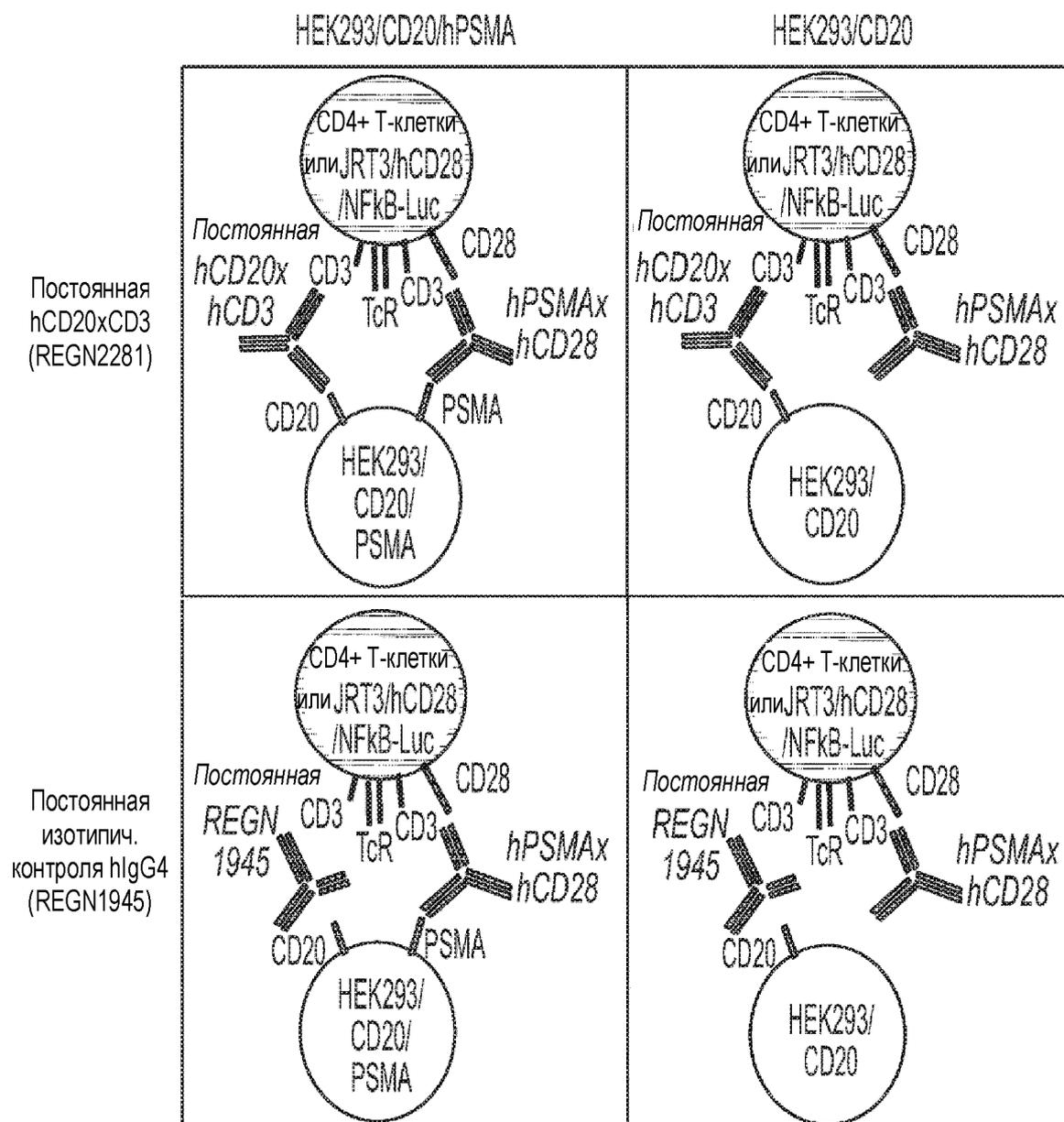


ФИГ. 1



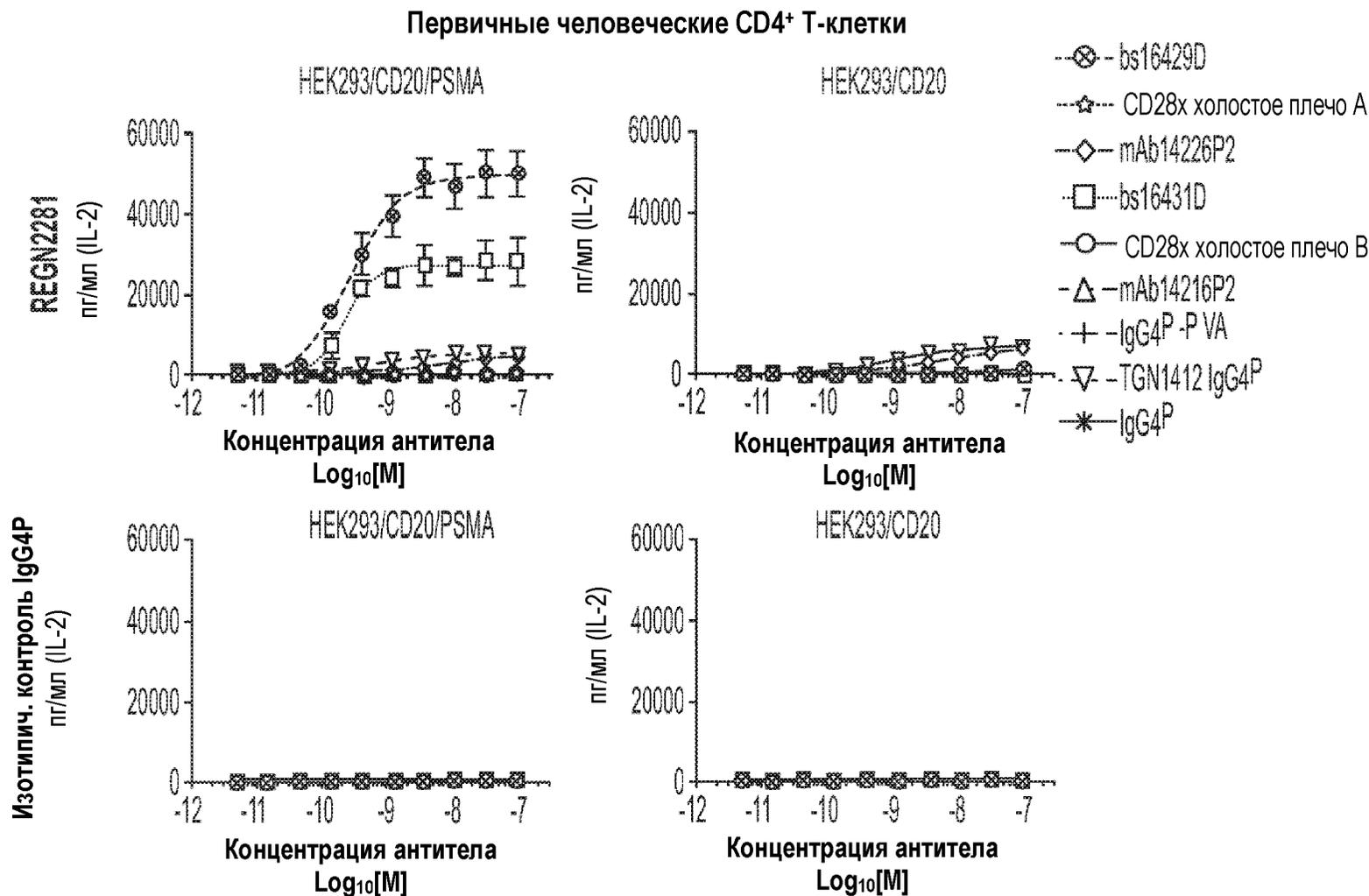
ФИГ. 2

Схема исходного и генетически модифицированного биоанализа для исследования биспецификов PSMA X CD28



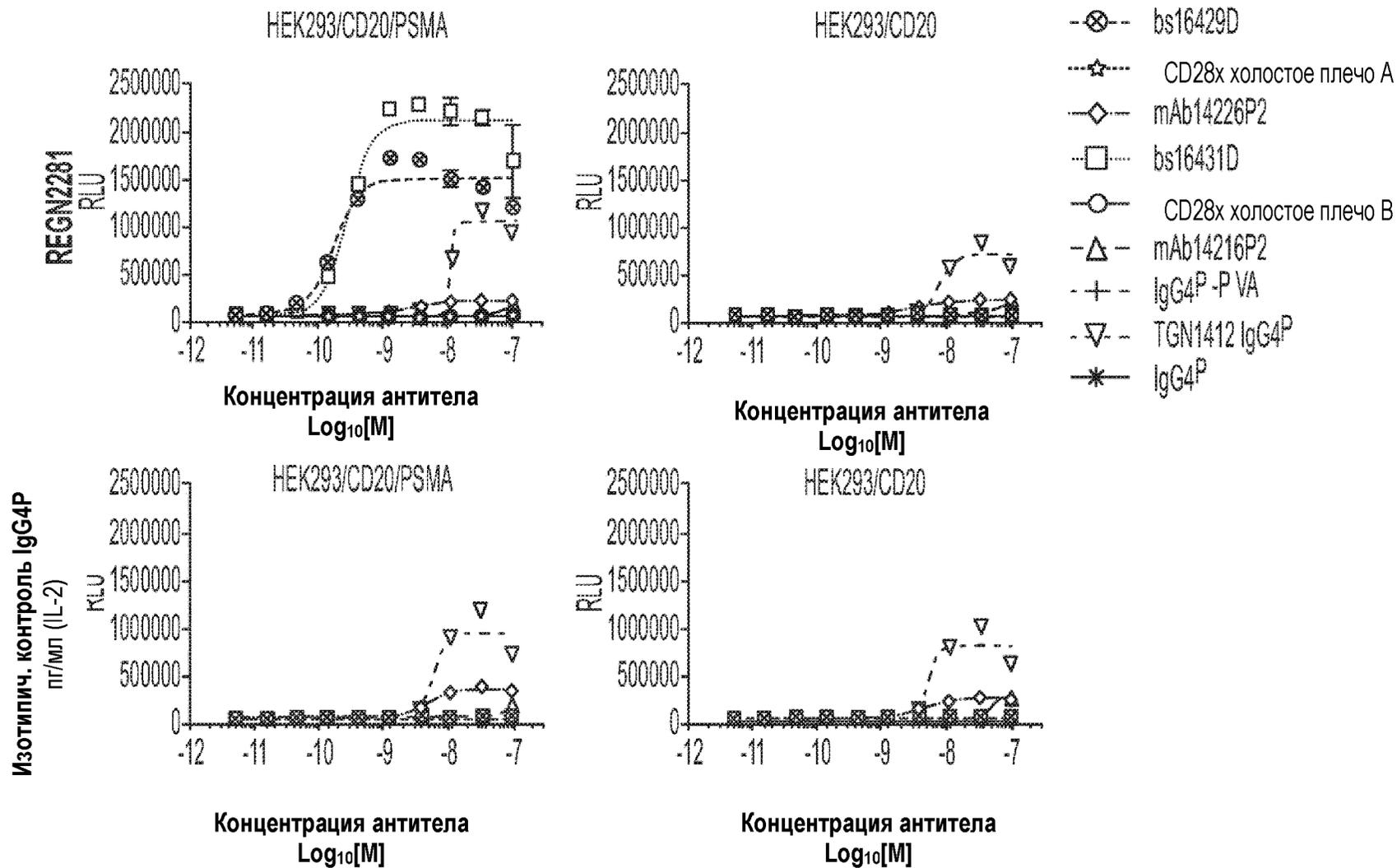
ФИГ. 3

Активация CD4+ Т-клеток и генетически модифицированных клеток JRT3.T3/ 1G4/hCD28 усиливается под воздействием hPSMA X hCD28 в условиях первичной стимуляции (REGN2281) и PSMA, экспрессируемого на клетках HEK293/hCD20

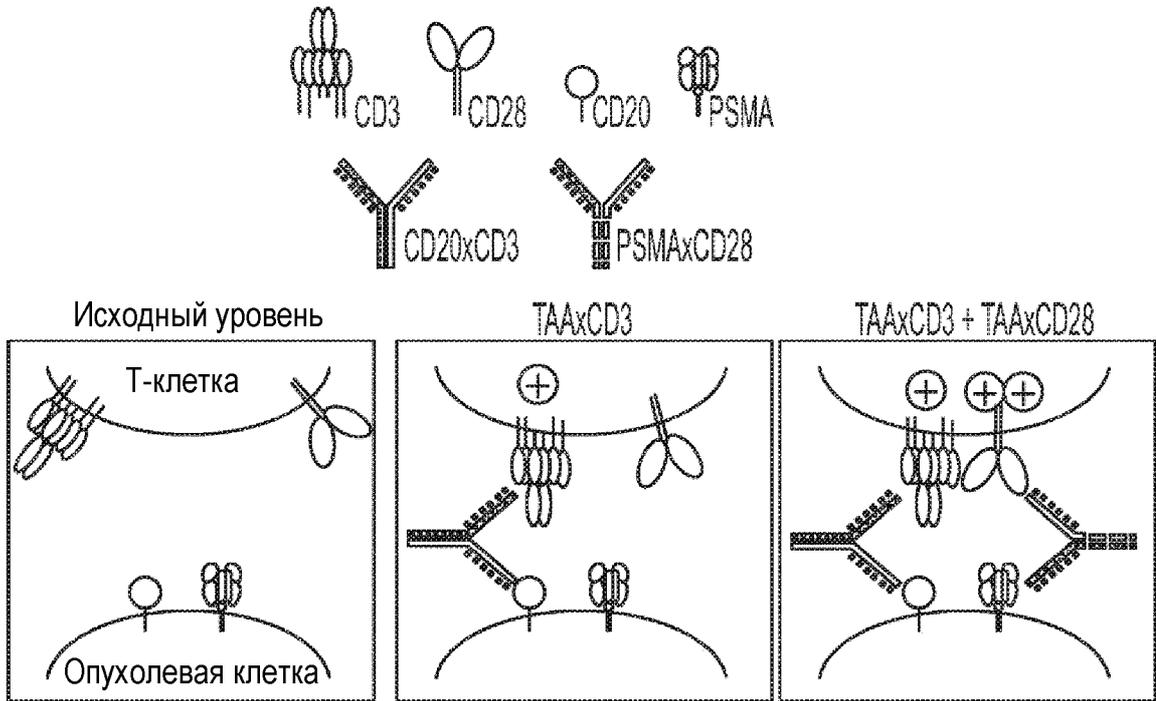


ФИГ. 4А

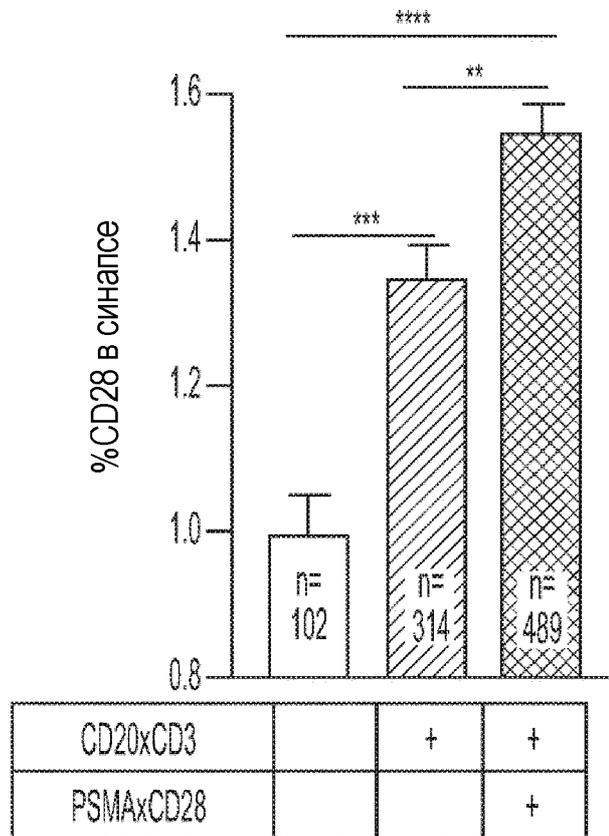
JRT3.T3/TCR/hCD28/hCD8ab/NFkB-Luc



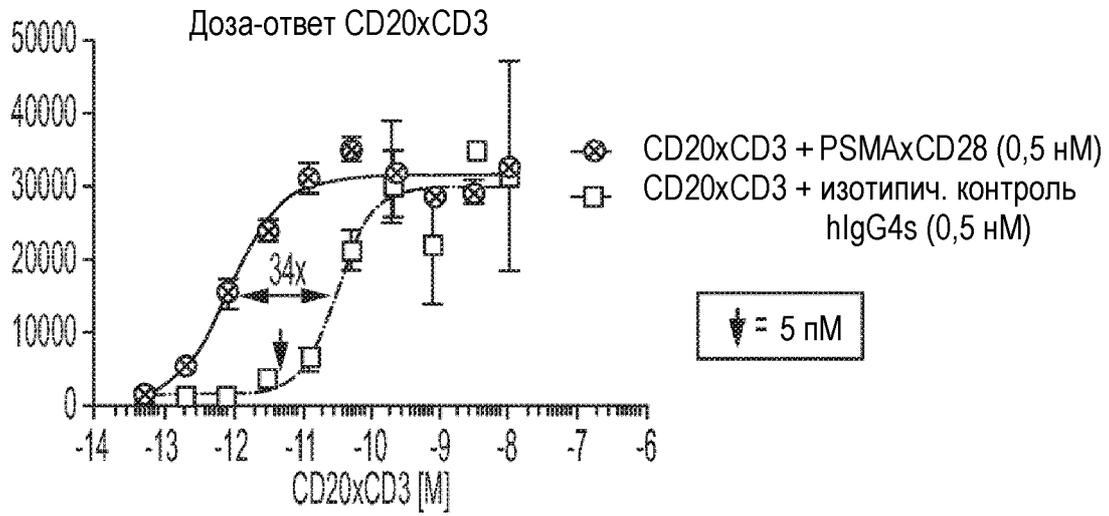
ФИГ. 4В



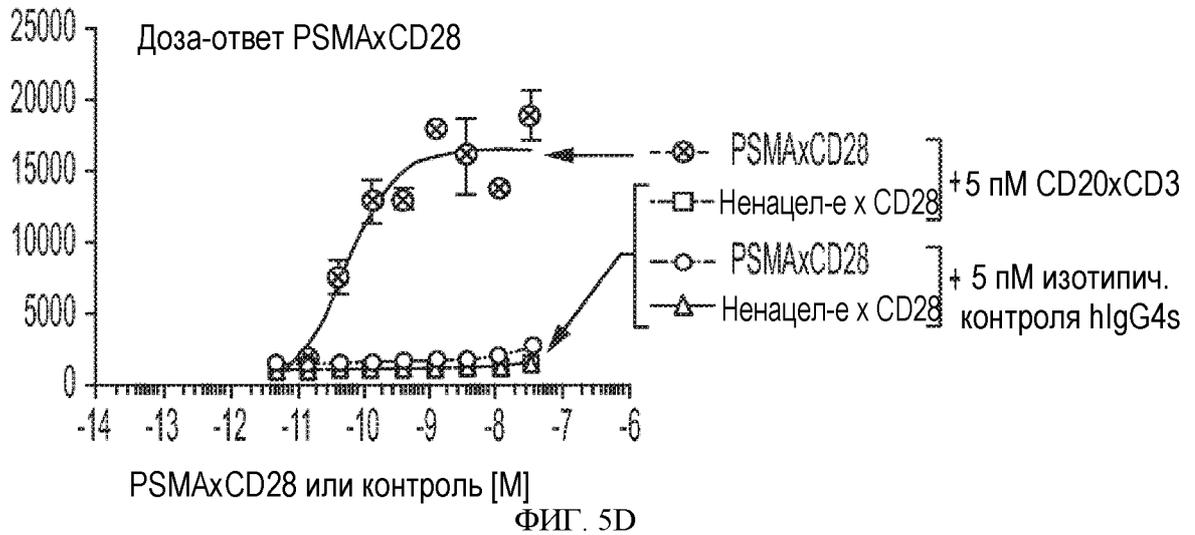
ФИГ. 5А



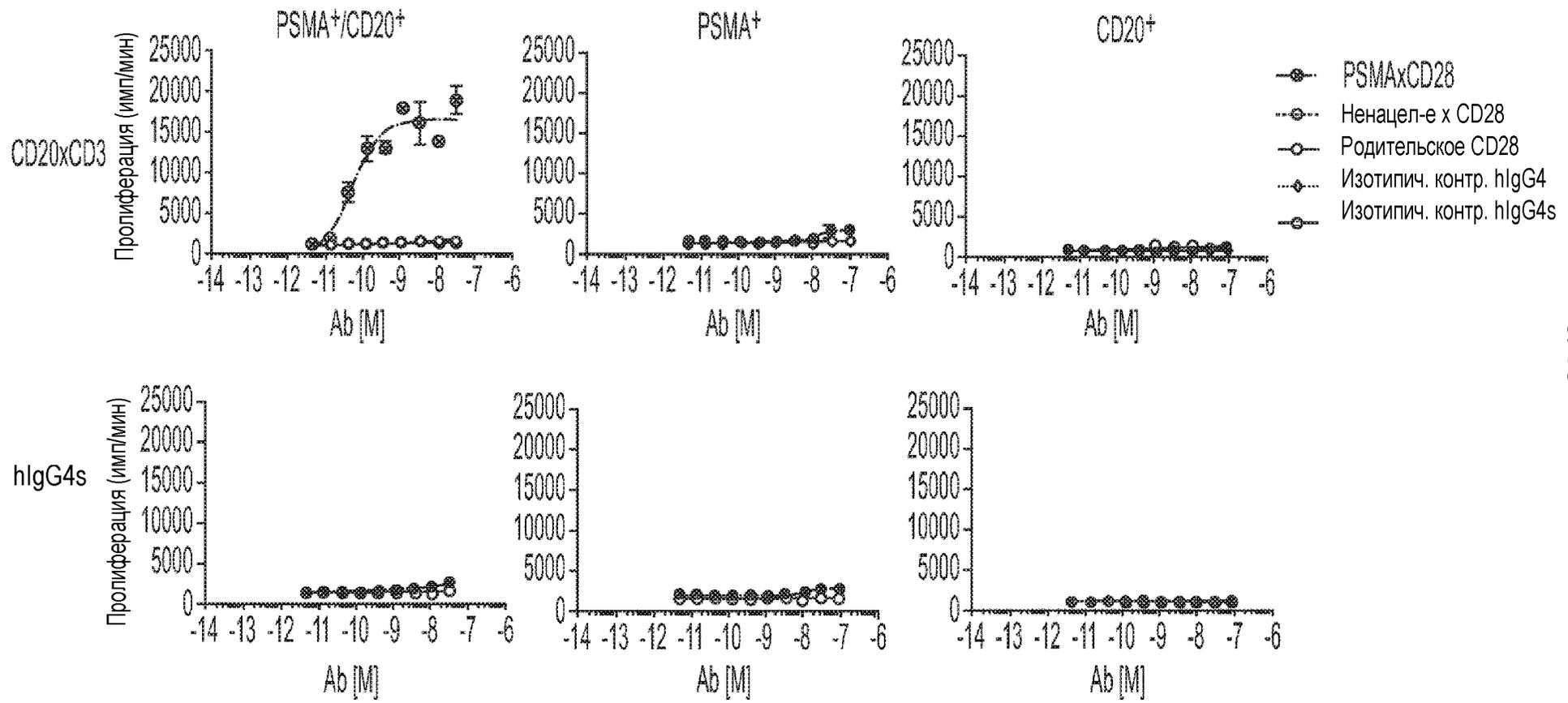
ФИГ. 5В



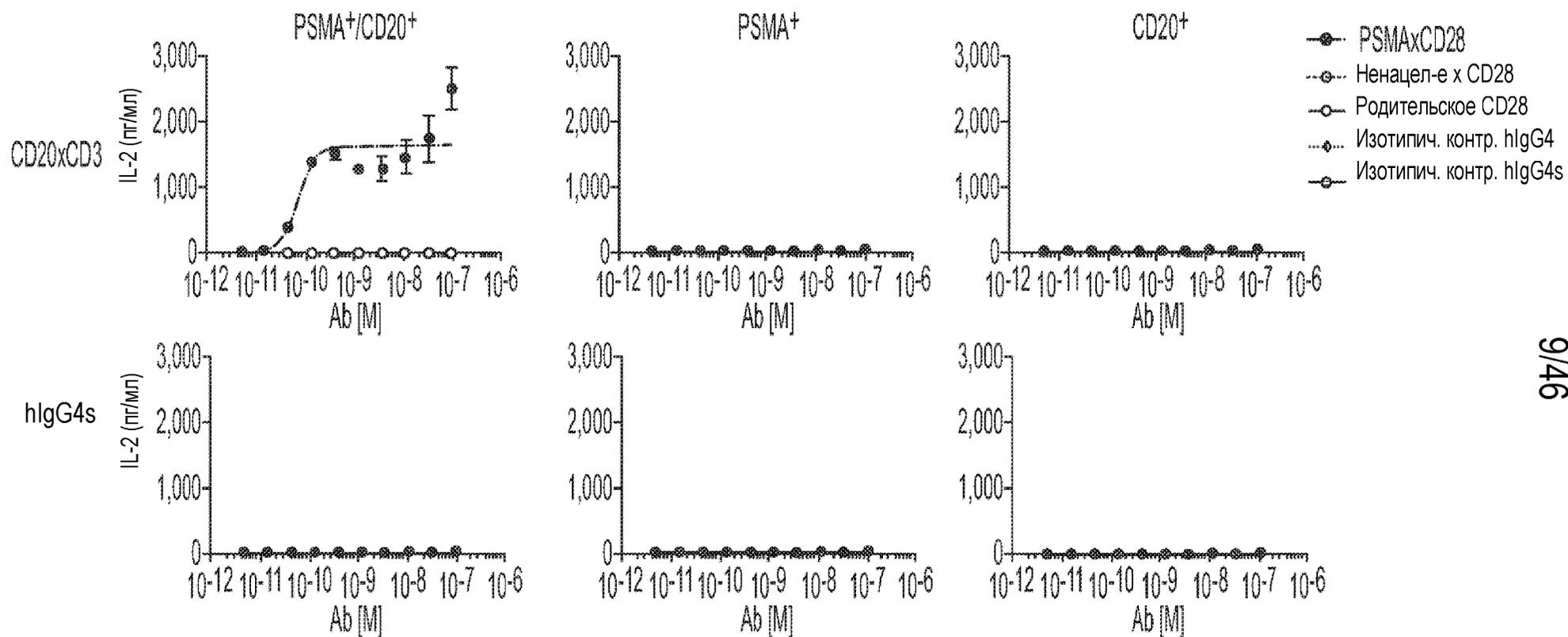
ФИГ. 5С



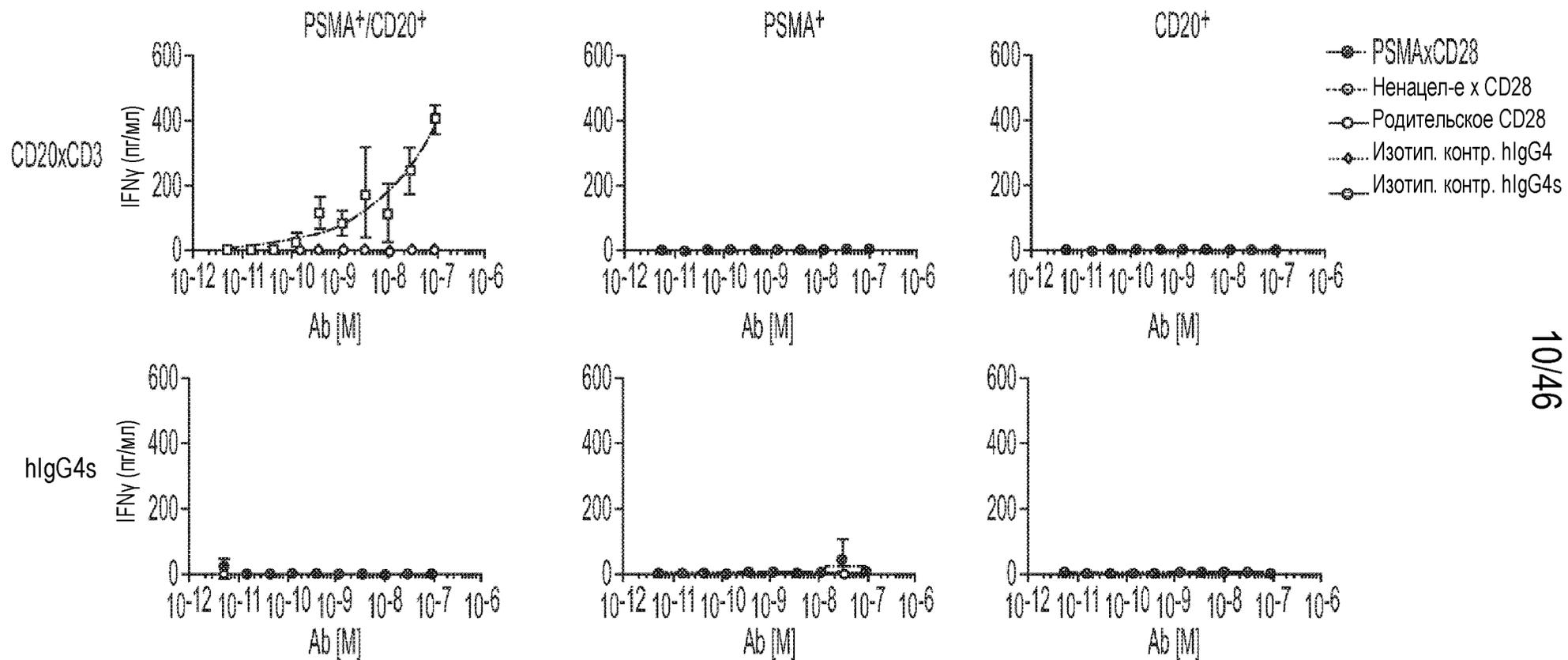
ФИГ. 5D



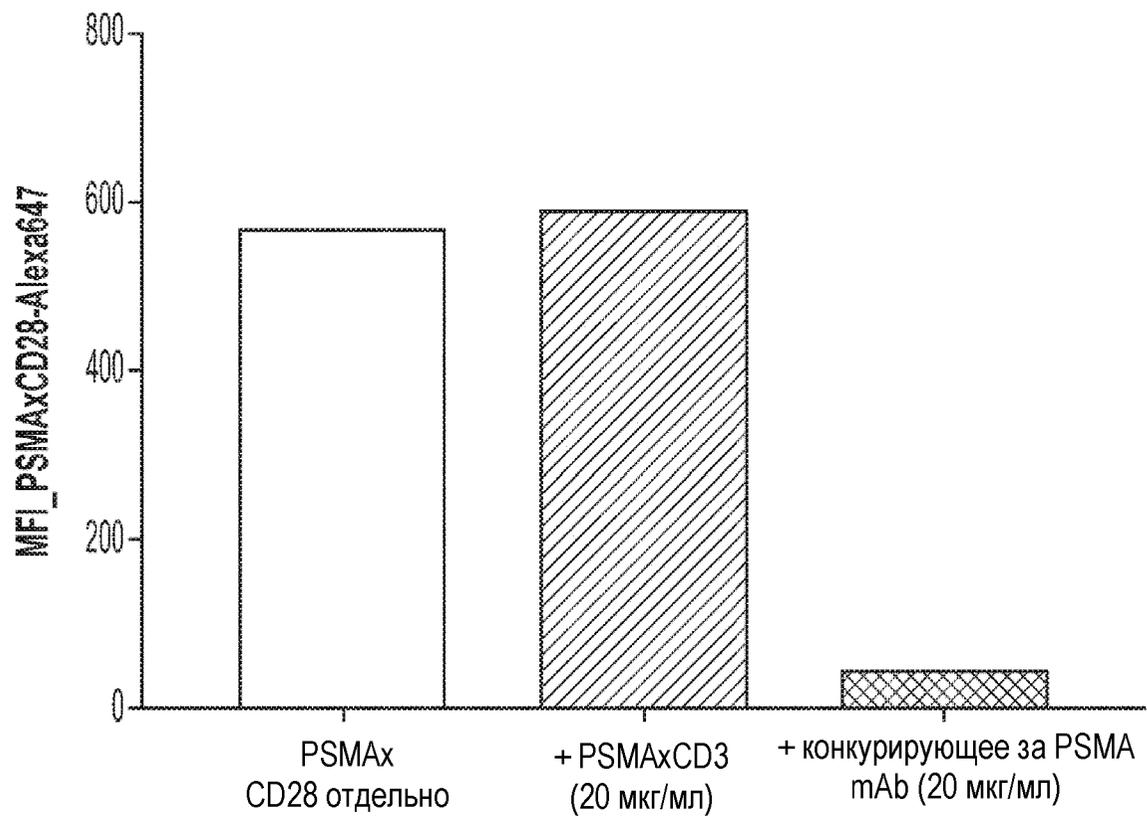
ФИГ. 5E



ФИГ. 5F



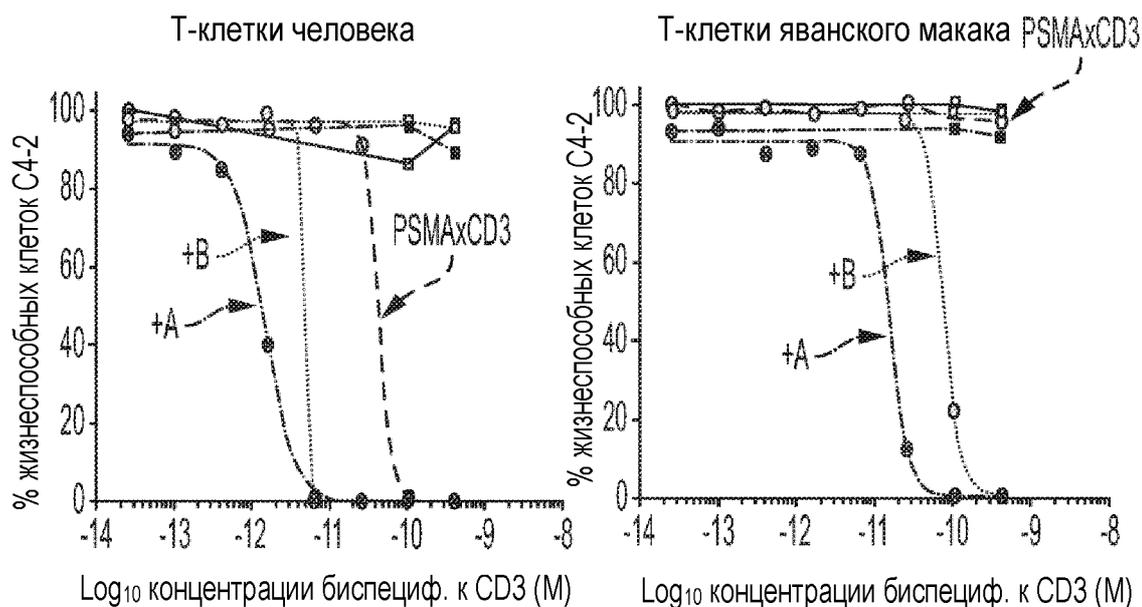
ФИГ. 5G



ФИГ. 5H

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА К PSMAxCD28 УСИЛИВАЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ bs13644D (PSMAxCD3) В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И Т-КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЯВАНСКОГО МАКАКА

————— Карцинома предстательной железы C4-2 —————



	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)	1.45e-012
bs13644D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)	~4.88e-012
bs13644D	4.347e-011

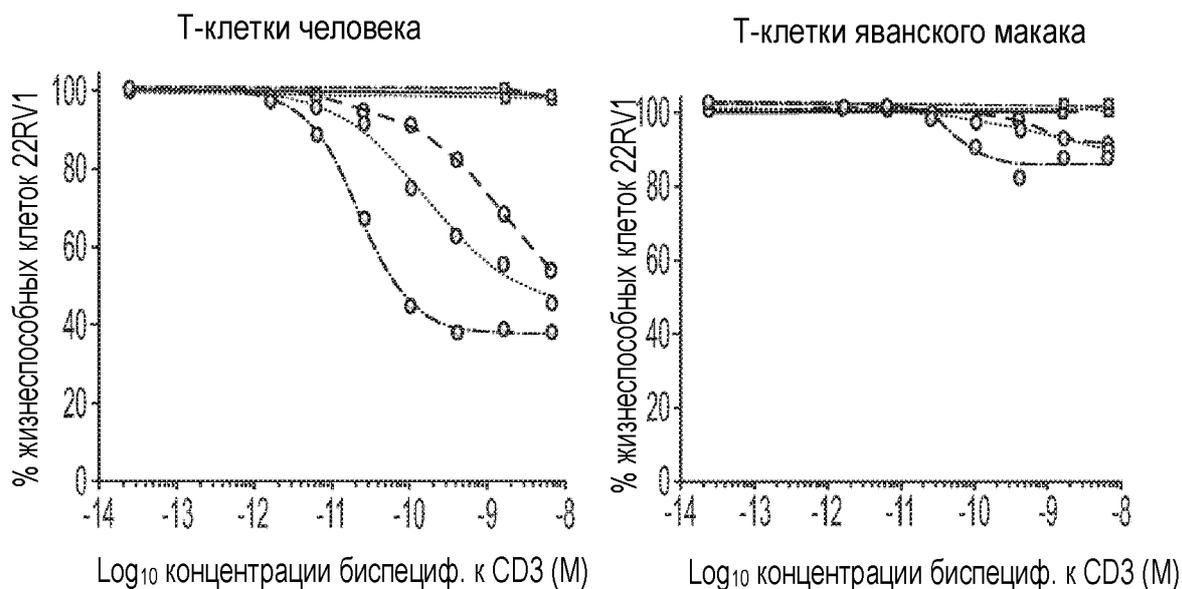
	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)	1.554e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)	7.723e-011

- bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)
- bs17664D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)
- bs17664D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)
- bs17664D + bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)
- bs13644D
- bs17664D

ФИГ. 6А

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА К PSMA $\times$ CD28 УСИЛИВАЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ bs13644D (PSMA $\times$ CD3) В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЯВАНСКОГО МАКАКА

Карцинома предстательной  
железы 22RV1

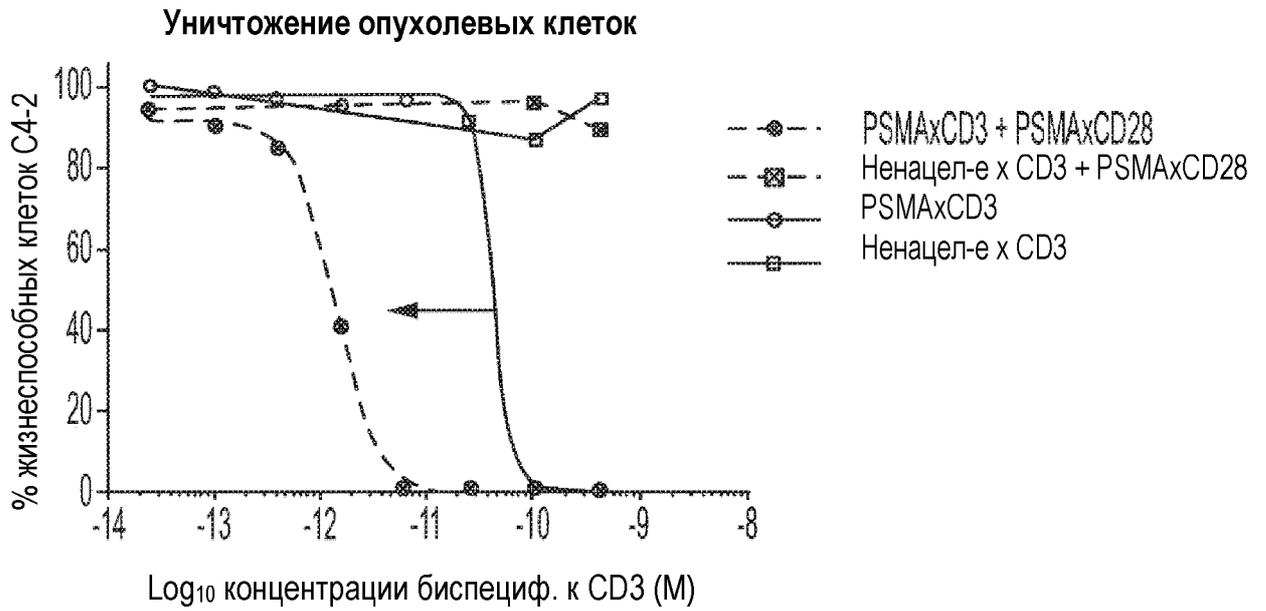


	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)	2.287e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)	1.669e-010
bs13644D	2.516e-009

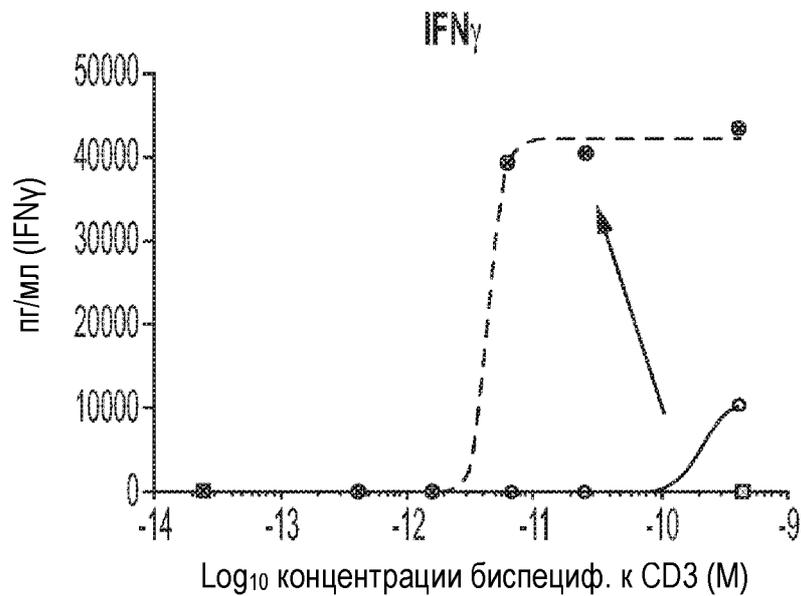
	EC50
bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)	5.516e-011
bs13644D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)	1.221e-009

- ⊗ bs13644D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)
- ⊠ bs17664D+ bs16429D (A) (2,5 мкг/мл)
- ⊙ bs17664D+ bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)
- ⊡ bs17664D + bs16431D (B) (2,5 мкг/мл)
- ⊖ bs13644D
- ⊞ bs17664D

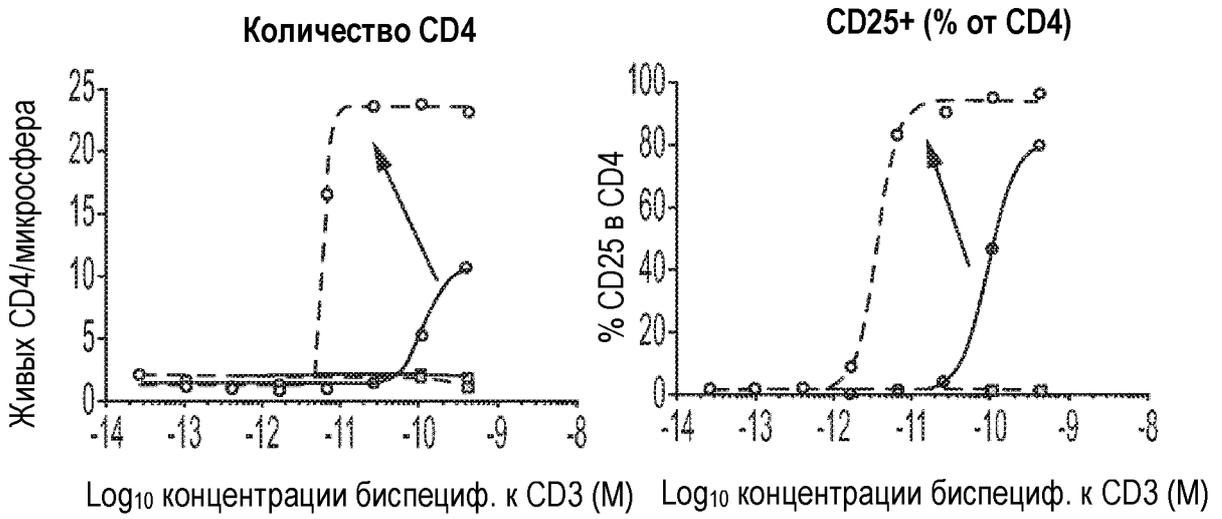
ФИГ. 6B



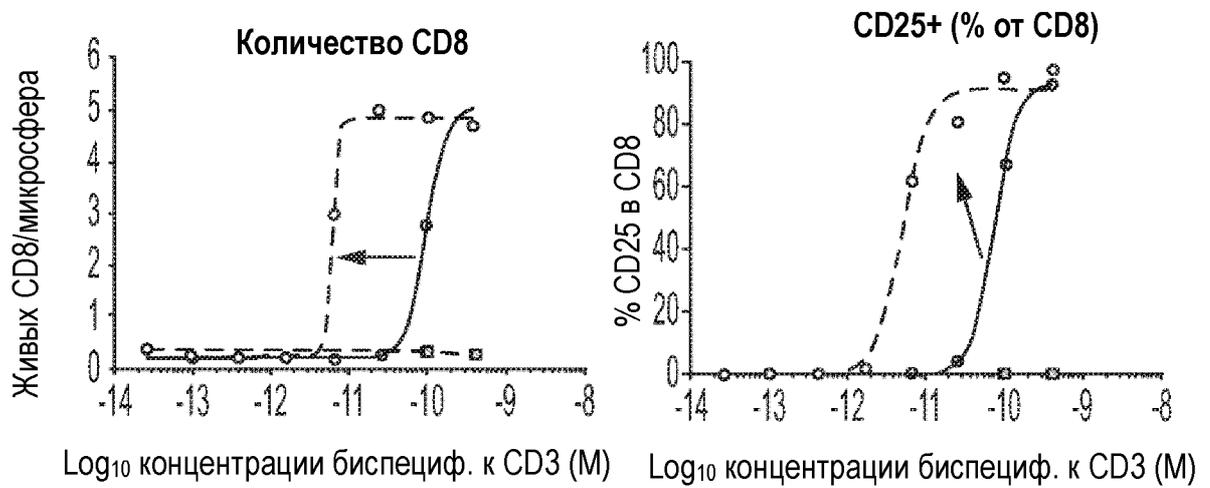
ФИГ. 7А



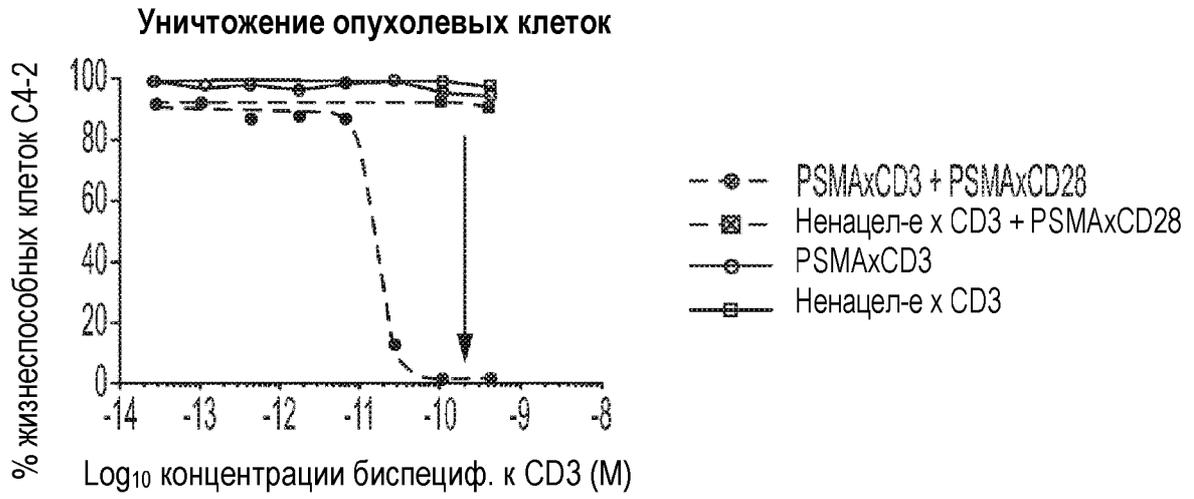
ФИГ. 7В



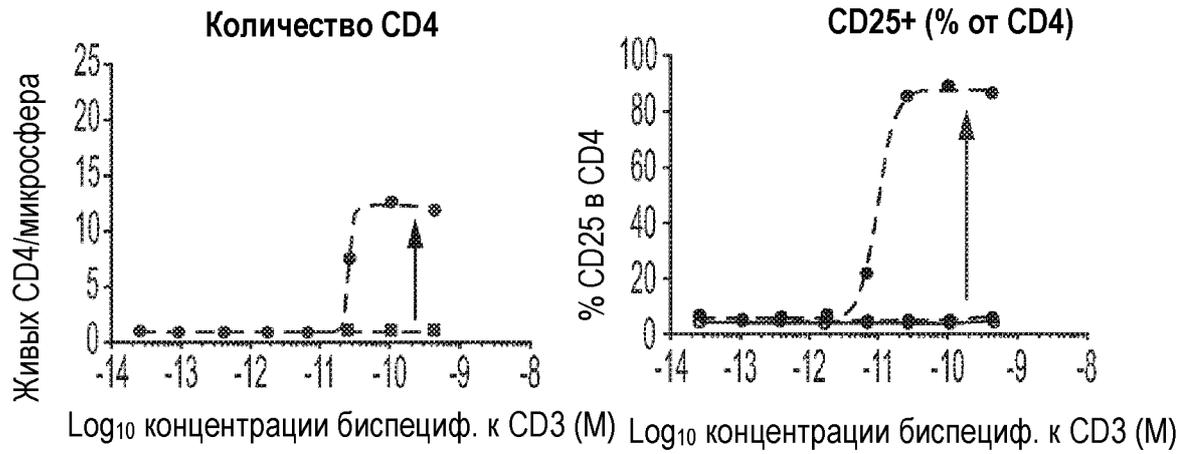
ФИГ. 7С



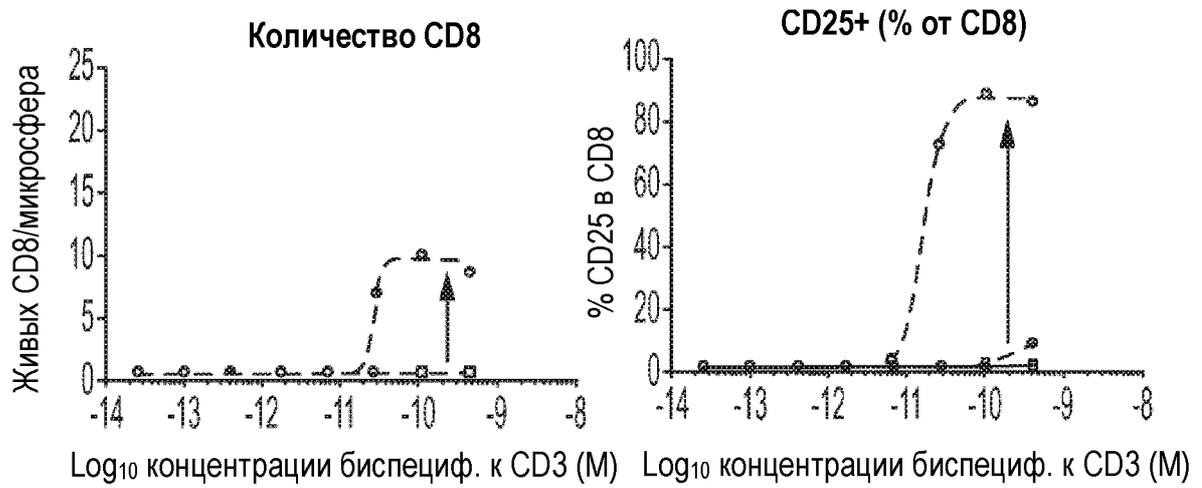
ФИГ. 7D



ФИГ. 7E

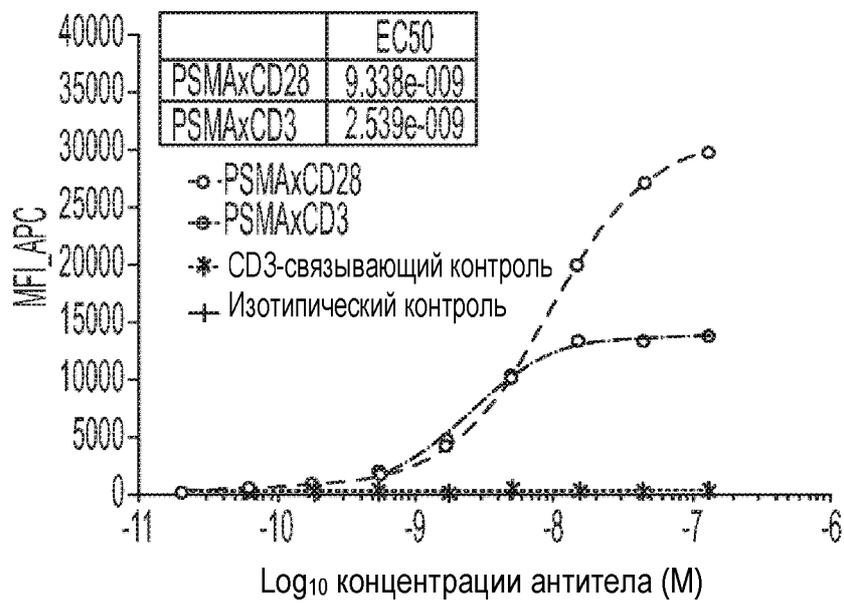


ФИГ. 7F



ФИГ. 7G

Связывание методом FACS

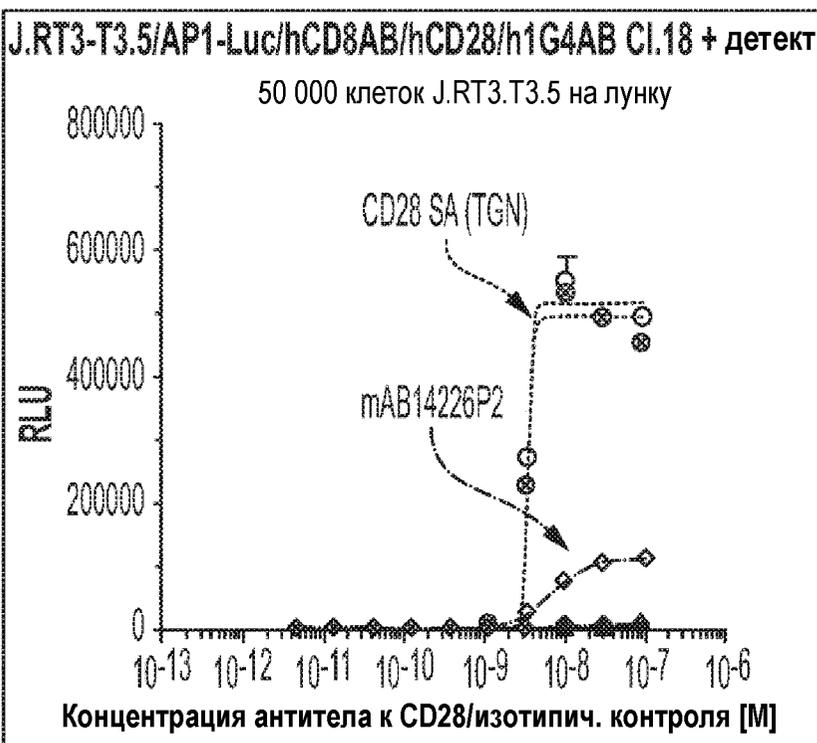
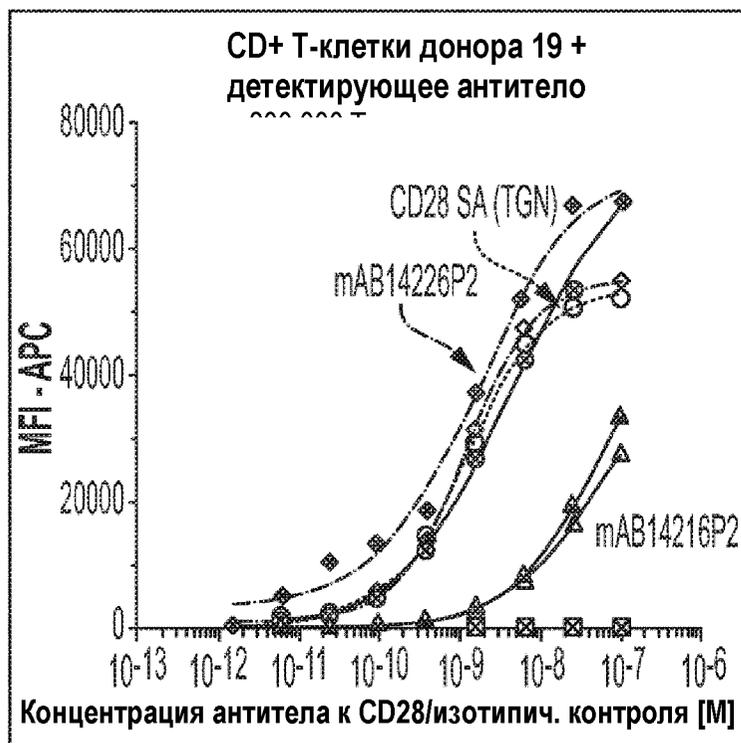


ФИГ. 7H

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ СУПЕРАГОНИСТА TGN И ДВУХВАЛЕНТНОГО АНТИТЕЛА  
К CD28 СОГЛАСНО ДАННОМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Связывание с  
клетками

Биоанализ люциферазного

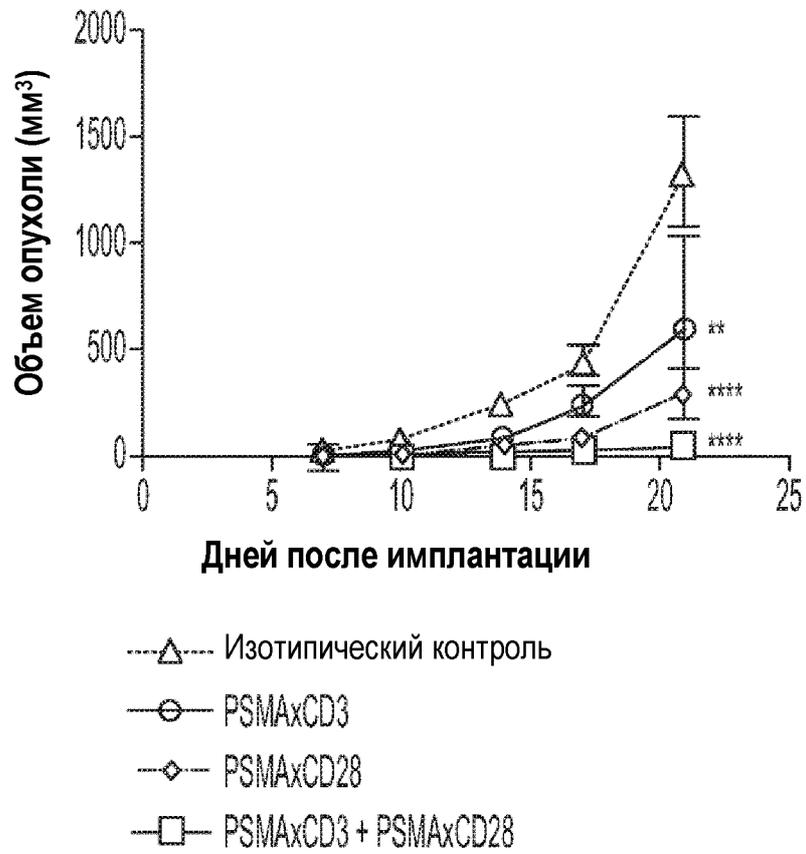


- ◆ mAb14226P2 (hlgG1)
- ◇ mAb14226P2 (hlgG4t)
- ▲ mAb14216P2 (hlgG1)
- △ mAb14216P2 (hlgG4t)
- CD28 SA (hlgG4)
- CD28 SA (hlgG4t)
- Изотипич. контр. hlgG1
- Изотипич. контр. hlgG4
- Изотипич. контр. hlgG4s

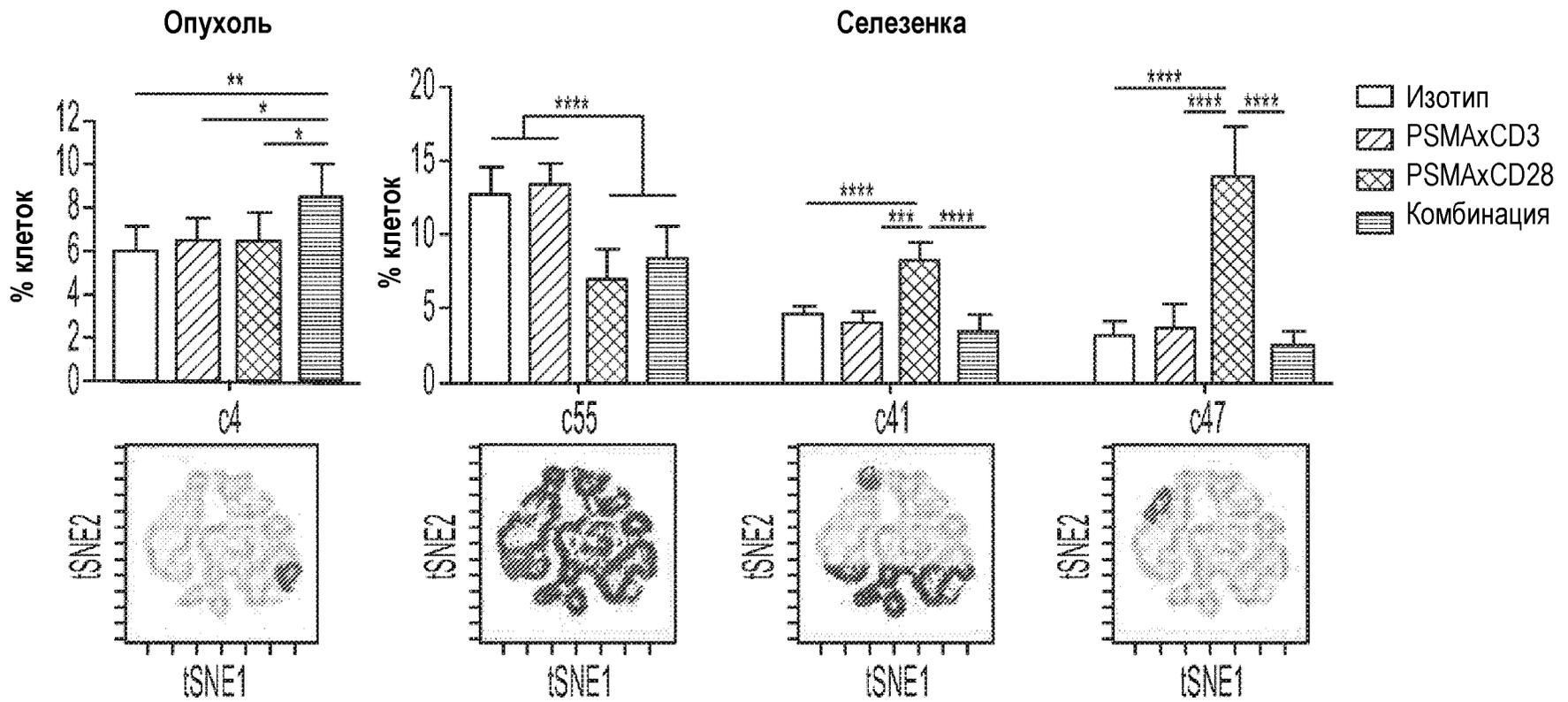
18/46

Схожее связывание с клетками на первичных CD4<sup>+</sup> Т-клетках

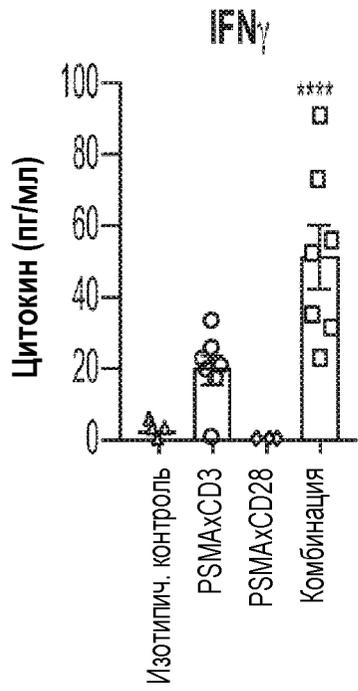
ФИГ. 8



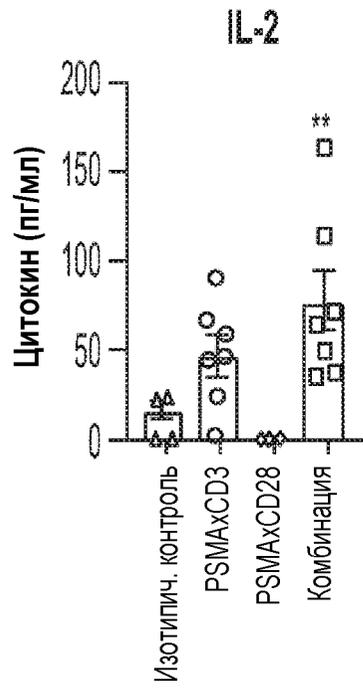
ФИГ. 9А



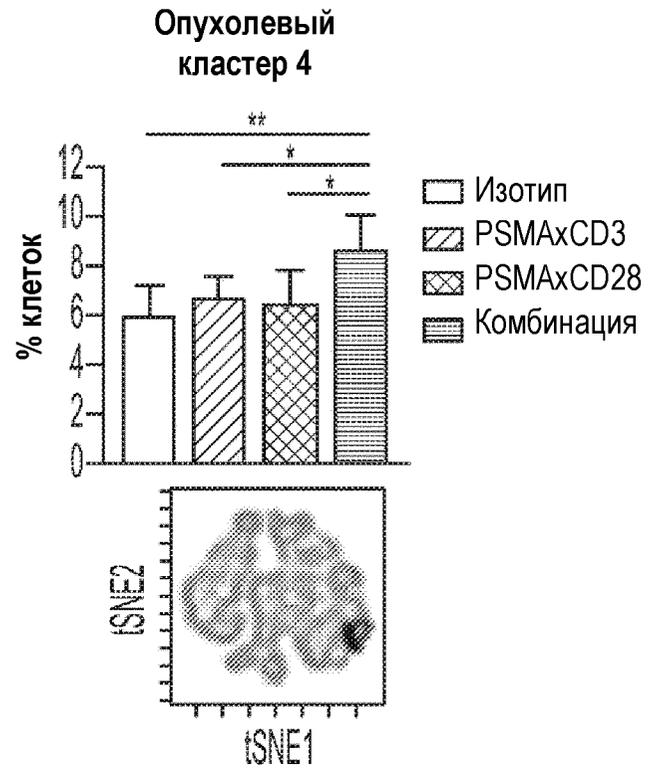
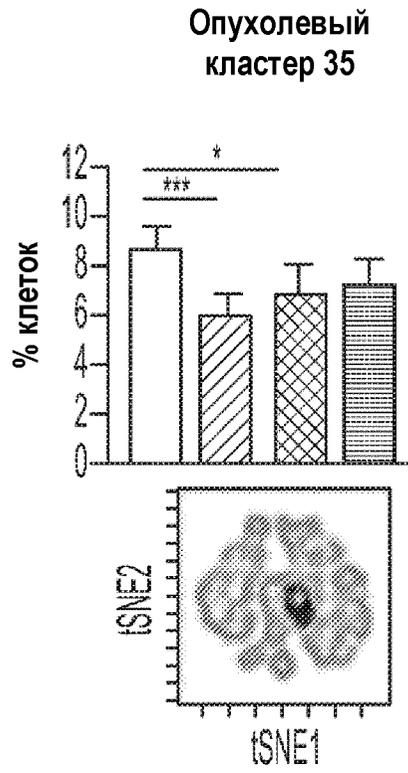
ФИГ. 9В



ФИГ. 9C



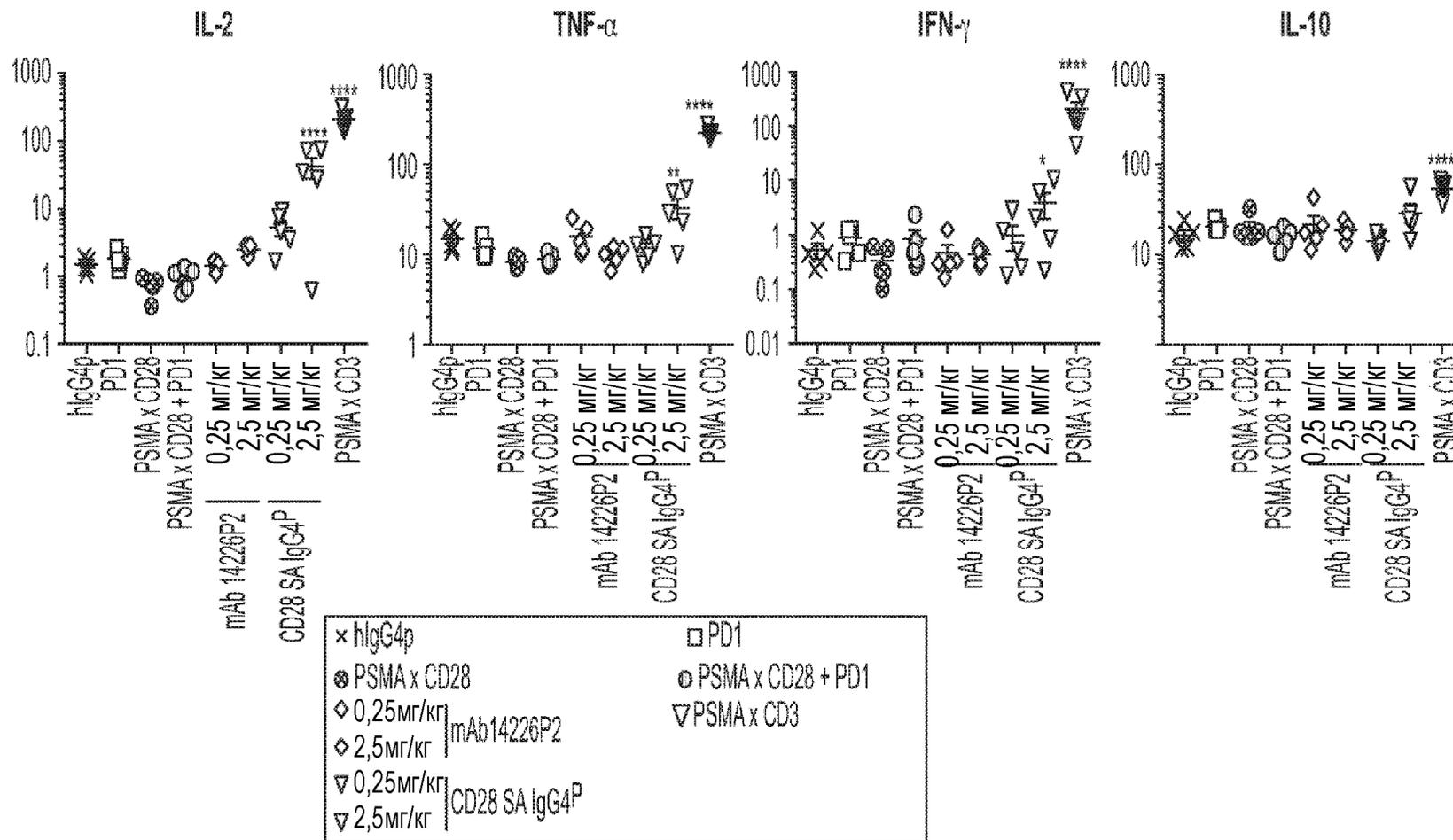
ФИГ. 9D



ФИГ. 9E

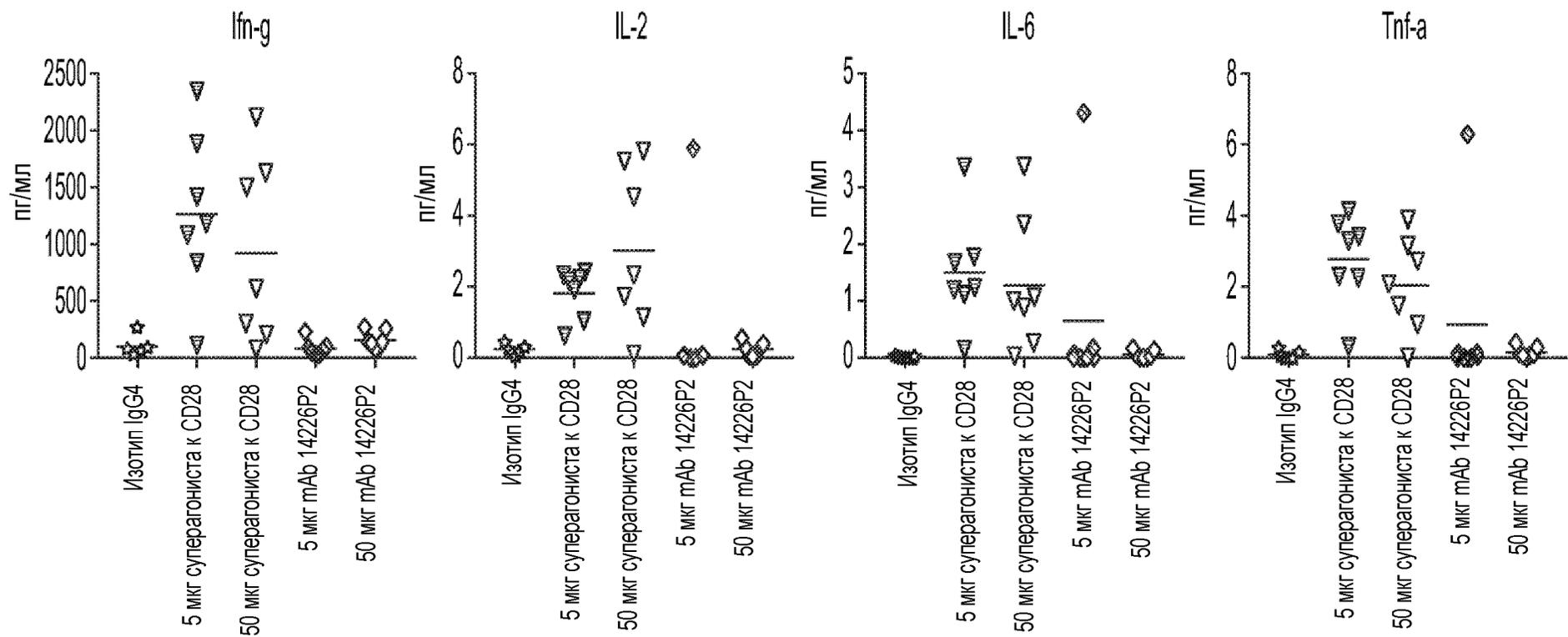
БИСПЕЦИФИКИ PSMA X CD28 ИЛИ РОДИТЕЛЬСКИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА К CD28 НЕ ИНДУЦИРУЮТ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ У ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ CD28/CD3/PSMA

4 часа после введения дозы



ФИГ. 10

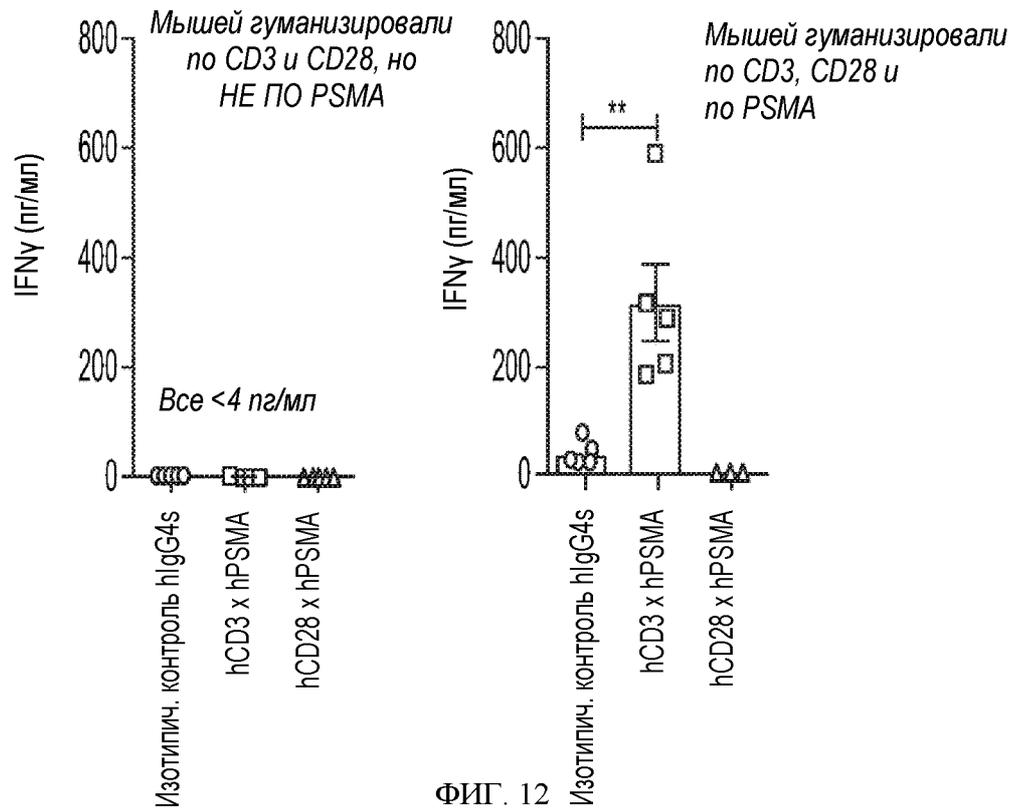
ЛЕЧЕНИЕ СУПЕРАГОНИСТОМ К CD28 ВЫЗЫВАЕТ ЦИТОКИНОВЫЙ ОТВЕТ ЧЕРЕЗ 4 ЧАСА У МЫШЕЙ NSG С ПРИВИТЫМИ МНПК, В ОТЛИЧИЕ ОТ mAb 14226P2 (РОДИТЕЛЬСКОЕ К CD28 «А»)



ФИГ. 11

ПОТЕНЦИАЛЬНО БОЛЕЕ БЕЗОПАСНЫЙ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ  
ПРОФИЛЬ КОСТИМУЛИРУЮЩИХ БИСПЕЦИФИКОВ

CD3 x PSMA вызывает повышенные уровни IFN $\gamma$  у гуманизированных  
мышей, в отличие от CD28xPSMA

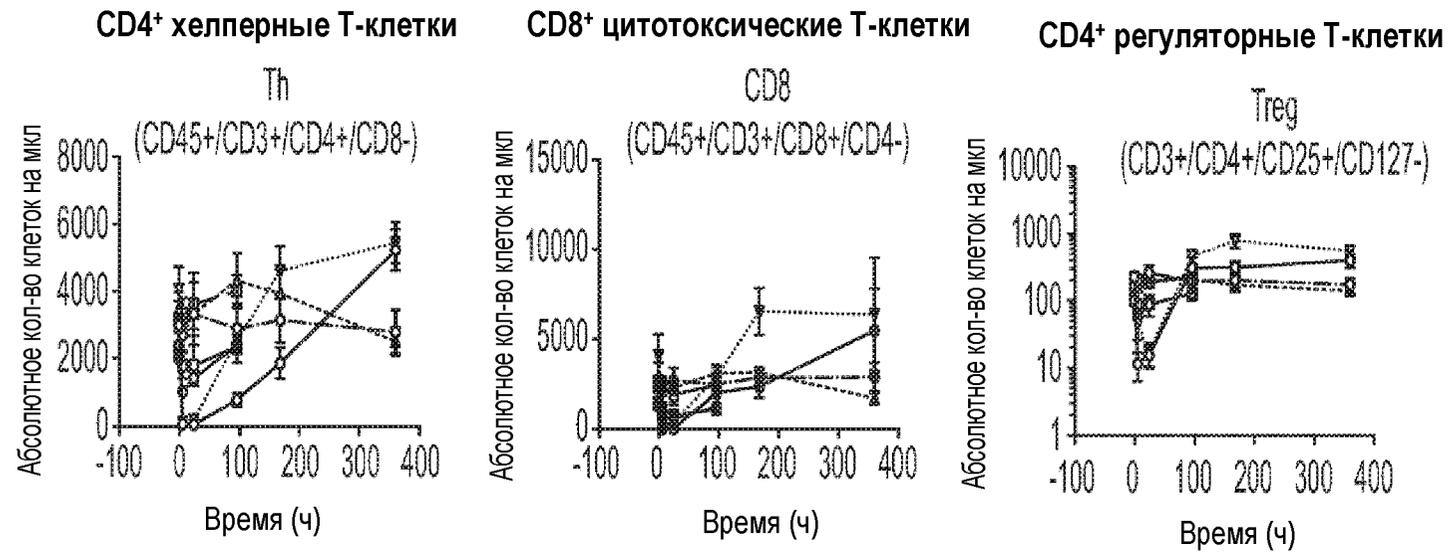


ИССЛЕДОВАНИЕ НА НЕЧЕЛОВЕКООБРАЗНЫХ ПРИМАТАХ: PSMA X CD28 НЕ ДЕМОНИСТРИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИЛИ МАРГИНАЦИЮ Т-КЛЕТОК ПО СРАВНЕНИЮ С PSMA X CD3 И СУПЕРАГОНИСТОМ К CD28

**Маргинация Т-клеток наблюдается при введении PSMAxCD3 и суперагониста к CD28, но не в случае bs16429D**

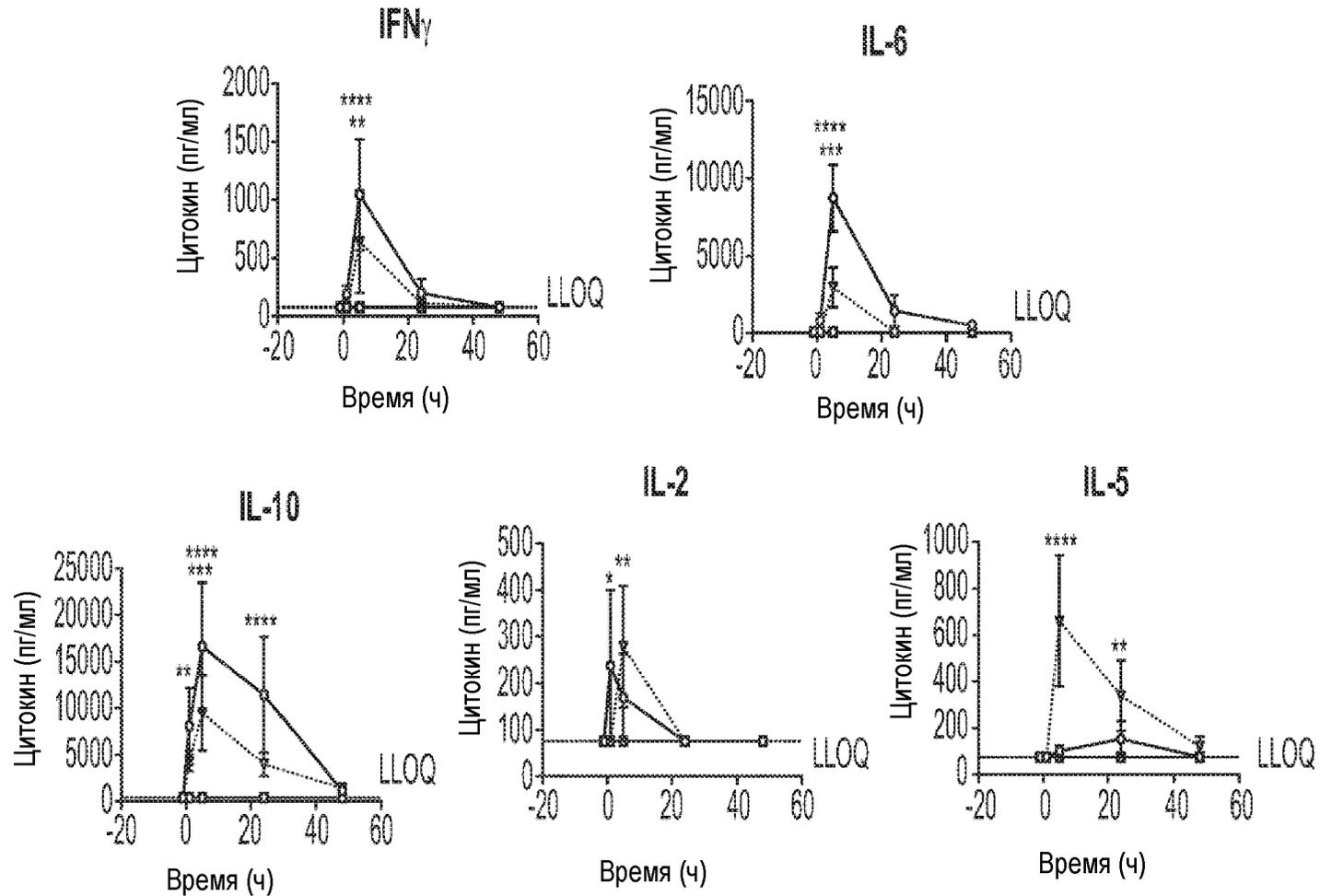
**Лечение (доза, мг/кг)**

- PSMA x CD3 (0.1)
- bs16429D (1)
- △ bs16429D (10)
- ▽ CD28 SA (10)
- ⊙ bs16429D + PD1 (10+10)
- bs16431D + PD1 (10+10)
- × EGFRVIII (10)

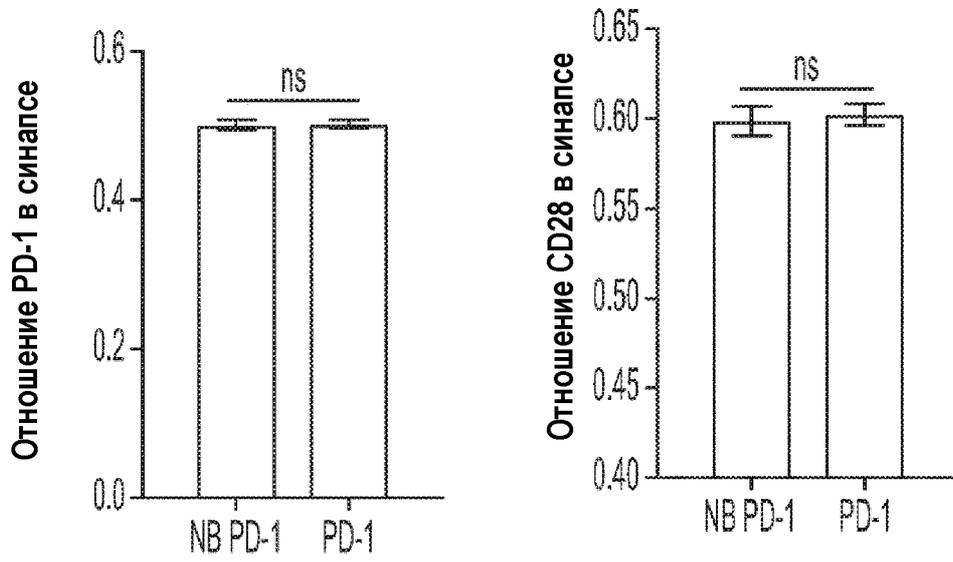


ФИГ. 13А

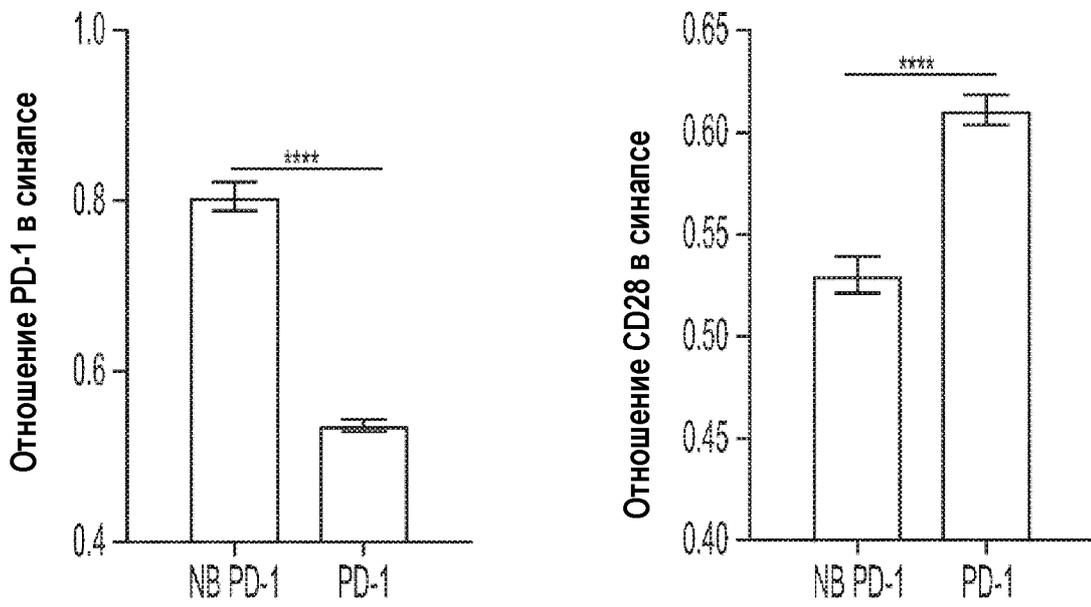
Индукция цитокинов через 5 ч после введения PSMAxCD3 и суперагониста к CD28, но не в случае PSMAxCD28



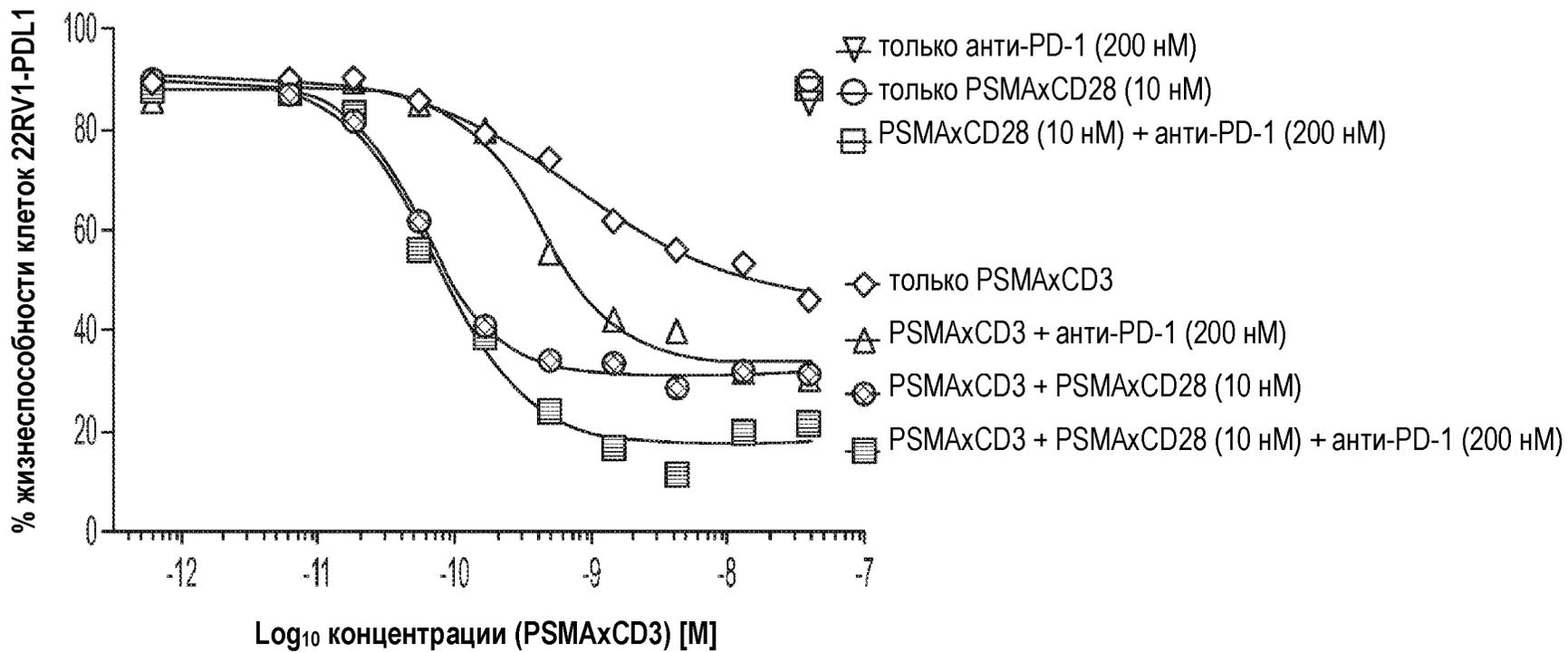
ФИГ. 13В



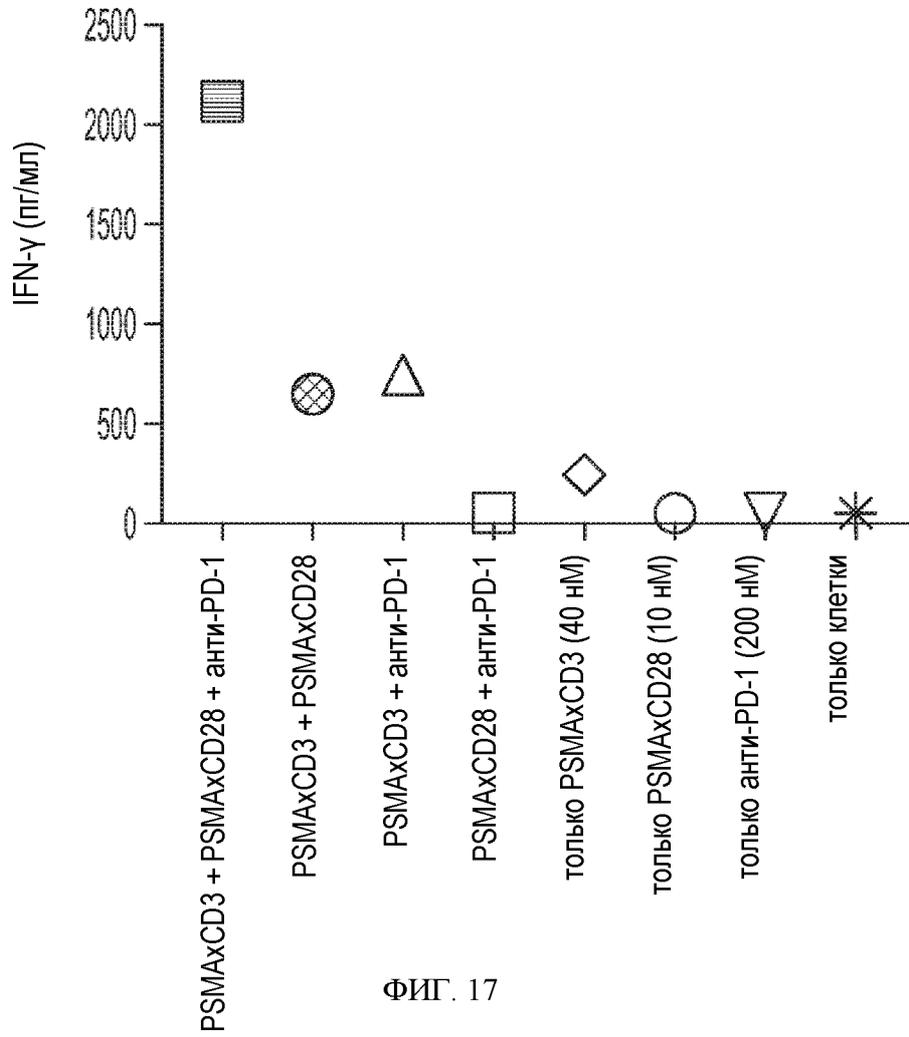
ФИГ. 14

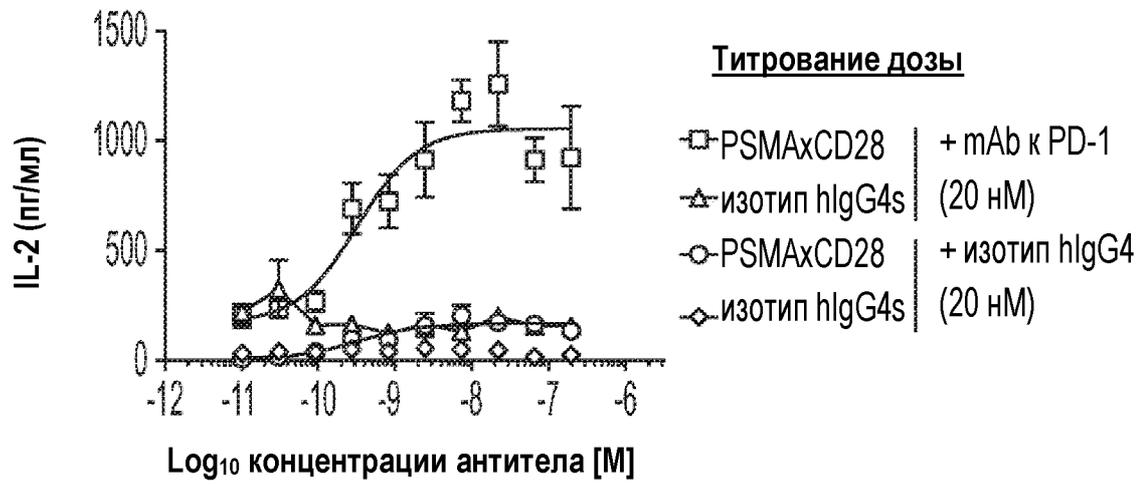


ФИГ. 15

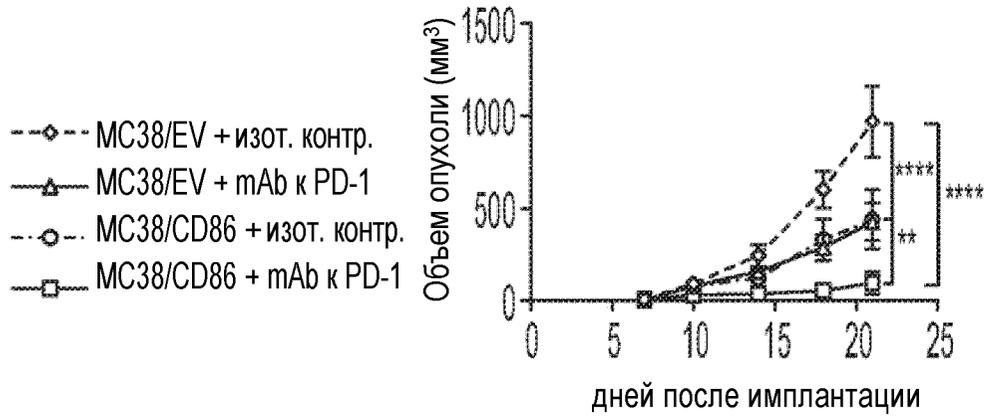


ФИГ. 16

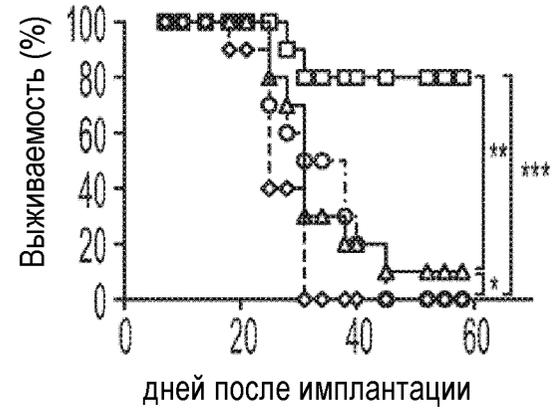




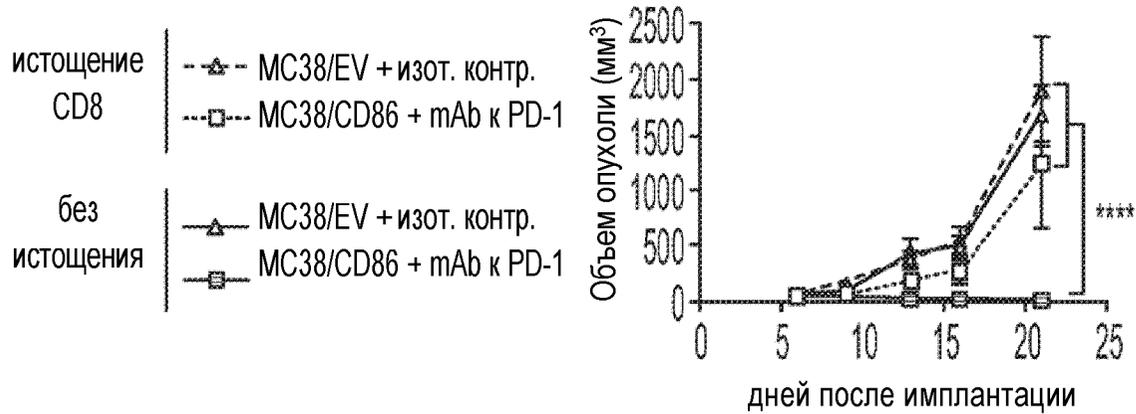
ФИГ. 18



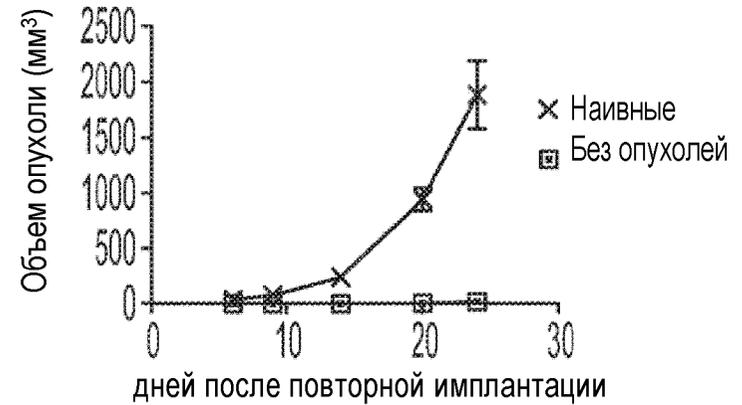
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В

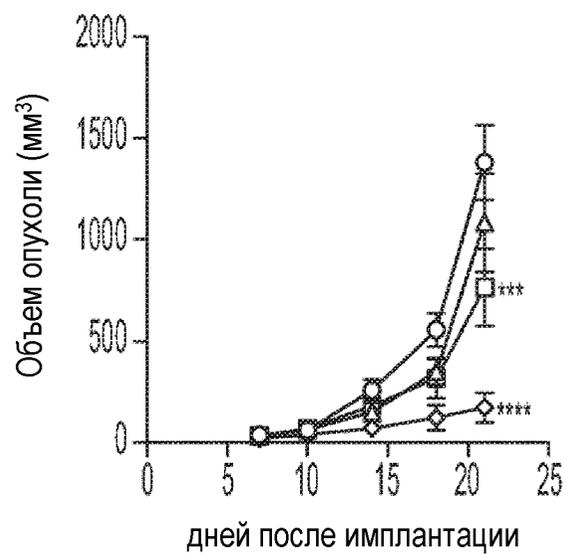


ФИГ. 19С

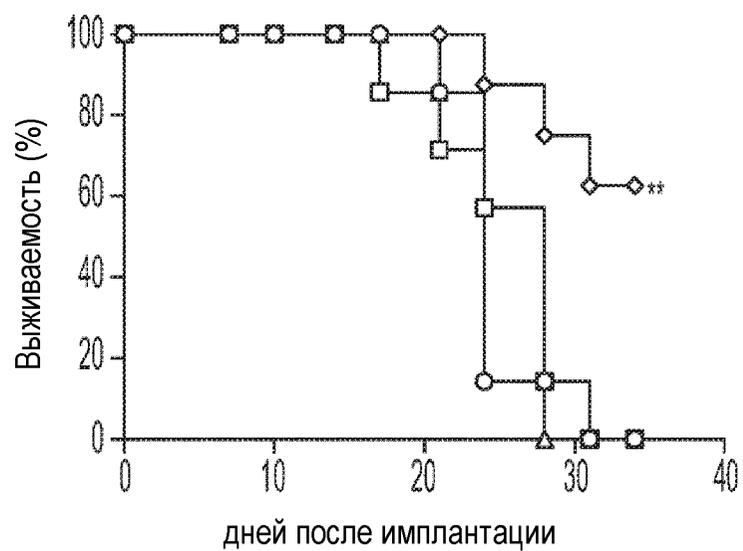


ФИГ. 19D

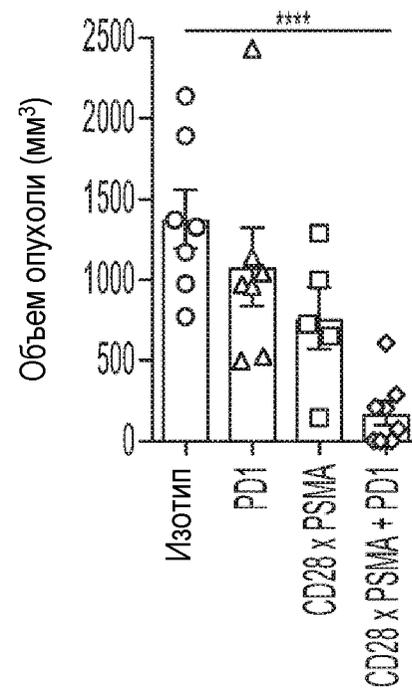
- Изотип
- △ PD1
- CD28 x PSMA
- ◇ CD28 x PSMA + PD1



ФИГ. 20А



ФИГ. 20В



ФИГ. 20С

**Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) на 21 день**

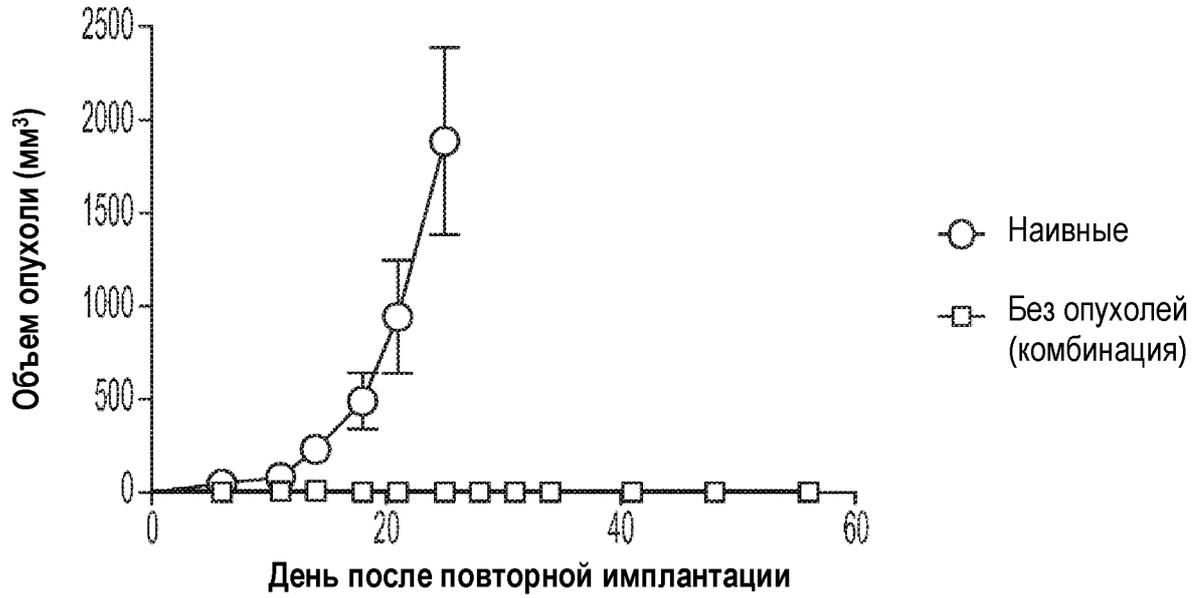
№ мыши	Изотип	PD1	CD28 x PSMA	CD28 x PSMA + PD1
М 1	1372,0	1044,0	147,9	4,0
М 2	1328,1	972,0	998,3	208,3
М 3	771,8	500,0	1289,1	0,0
М 4	976,6	2432,0	650,0	288,0
М 5	2137,5	1140,8		609,2
М 6	1892,3	958,8		0,0
М 7	1171,9	526,5	726,0	211,3
М 8				75,0

ФИГ. 20D

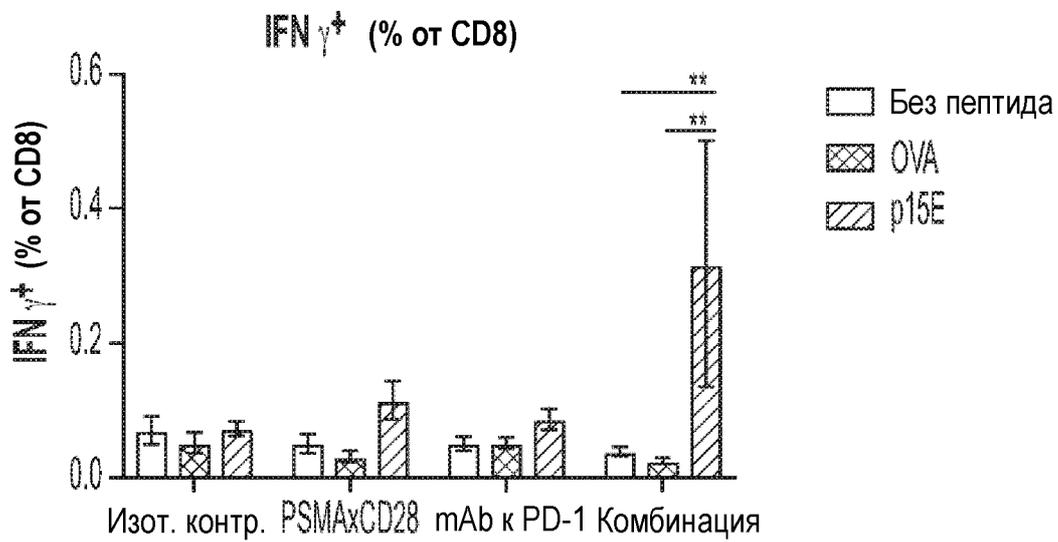
**% Без опухолей**

№ эксперимента	Изотип	PD1	CD28 x PSMA	CD28 x PSMA + PD1
1	0	0	0	38
2A	0	17	0	57
2B	0	33	0	50
3	0	0	33	82
4	0			29
5	0	0	0	13
6	0	0	0	13

ФИГ. 20E

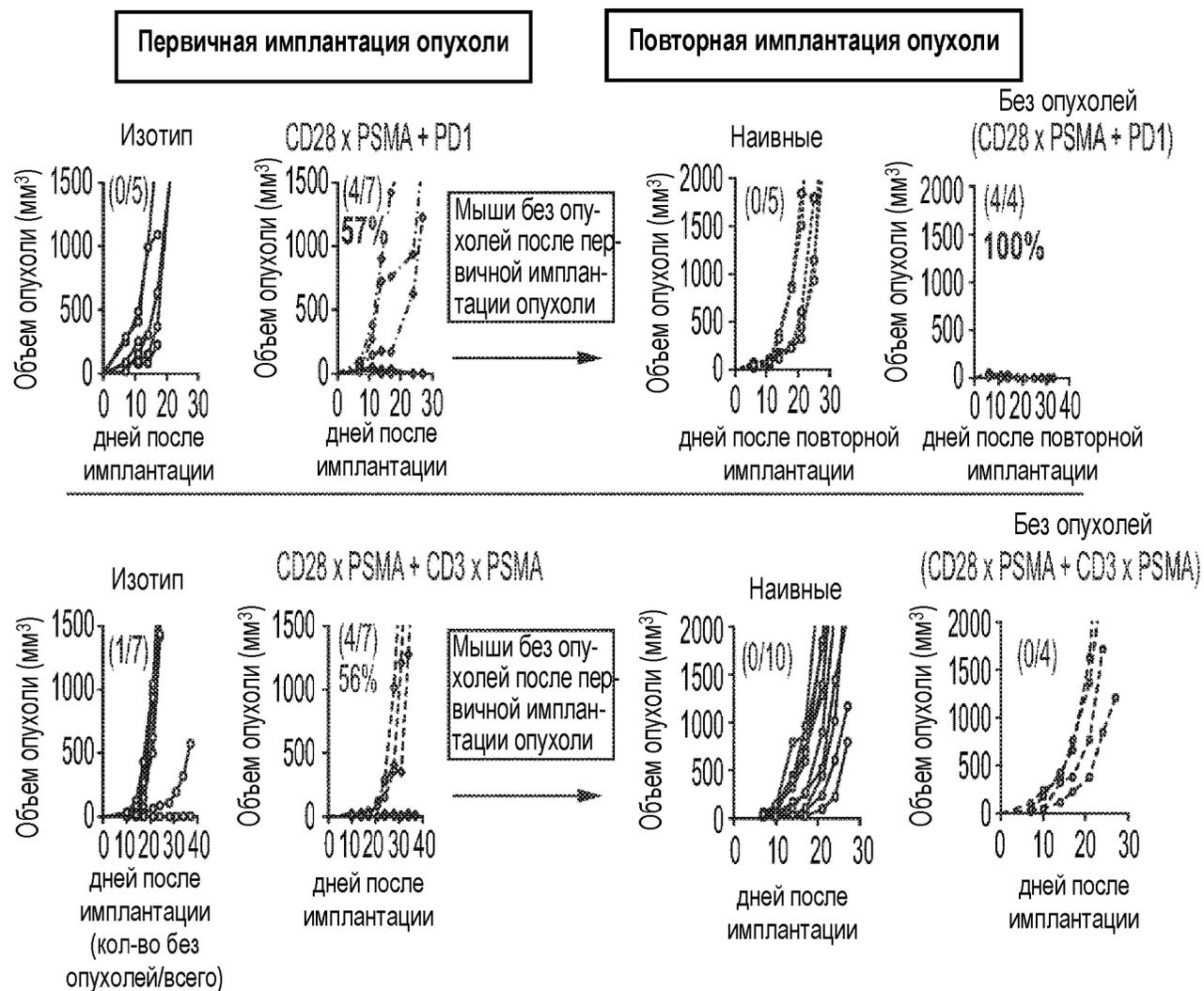


ФИГ. 21А

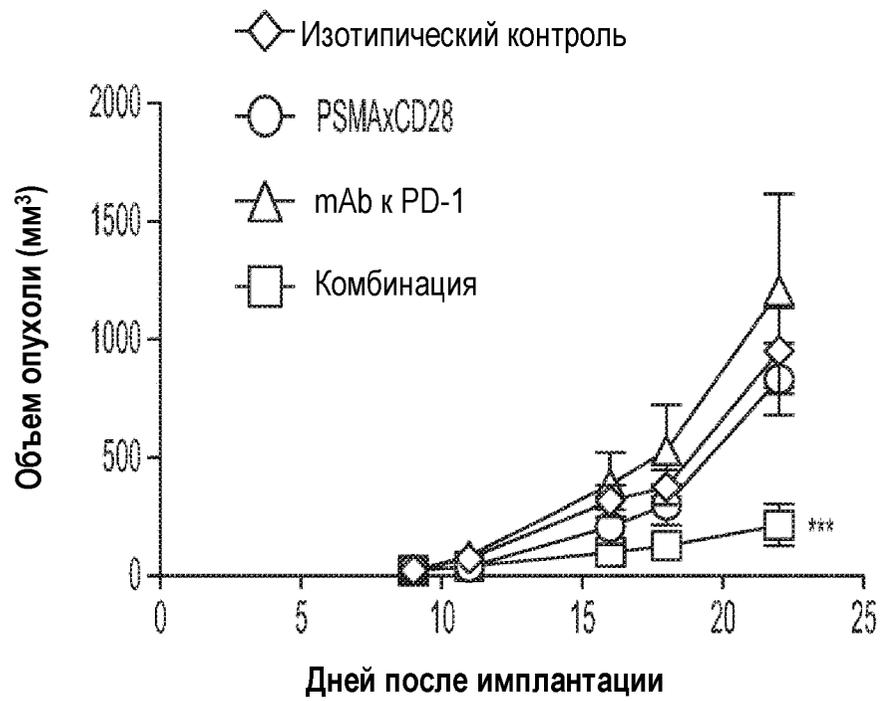


ФИГ. 21В

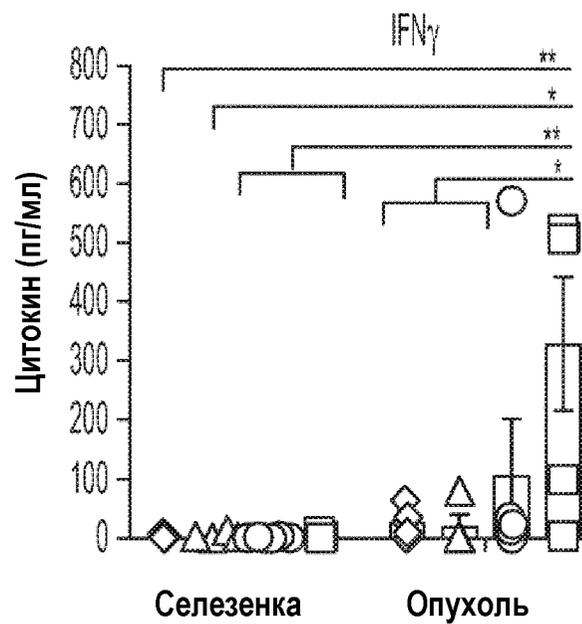
**МЫШИ БЕЗ ОПУХОЛЕЙ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ CD28 X PSMA + PD1, НО НЕ CD28 X PSMA + CD3 X PSMA, ОТТОРГАЮТ ПОВТОРНО ИМПЛАНТИРОВАННЫЕ ОПУХОЛИ**



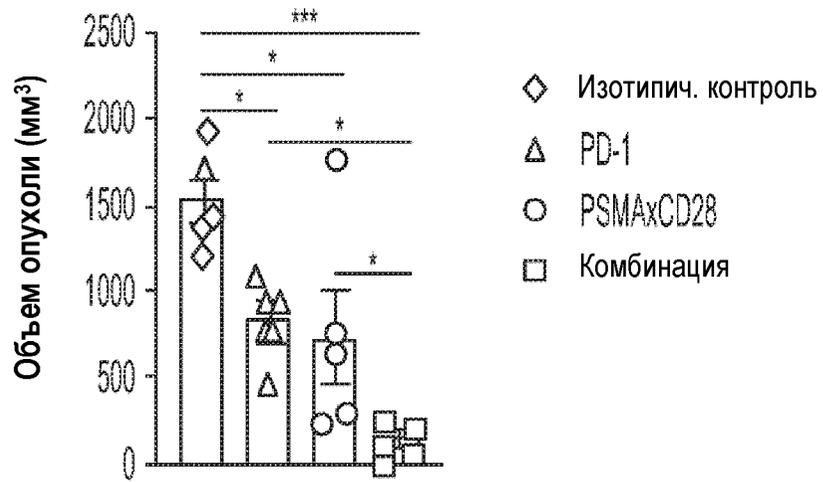
ФИГ. 21С



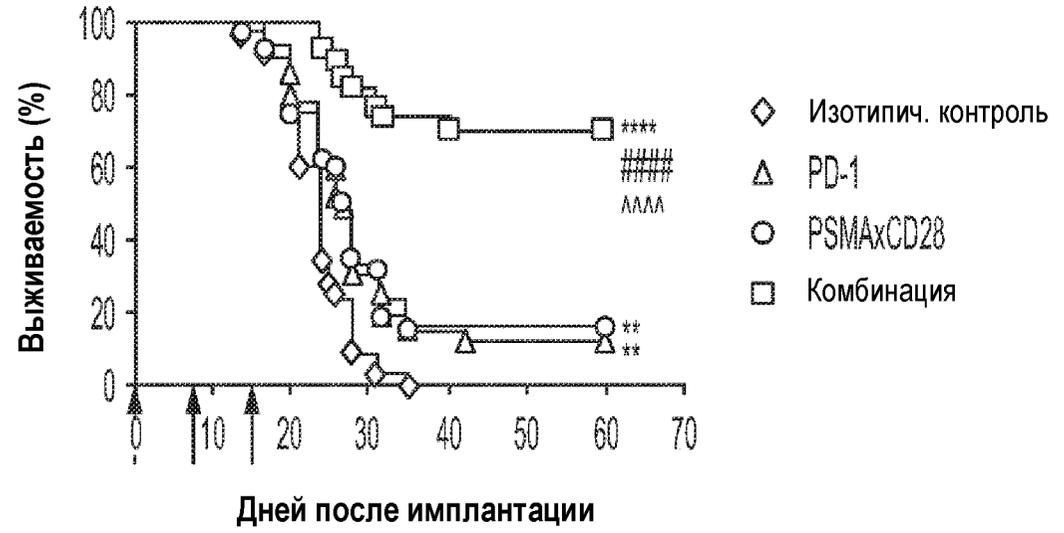
ФИГ. 22А



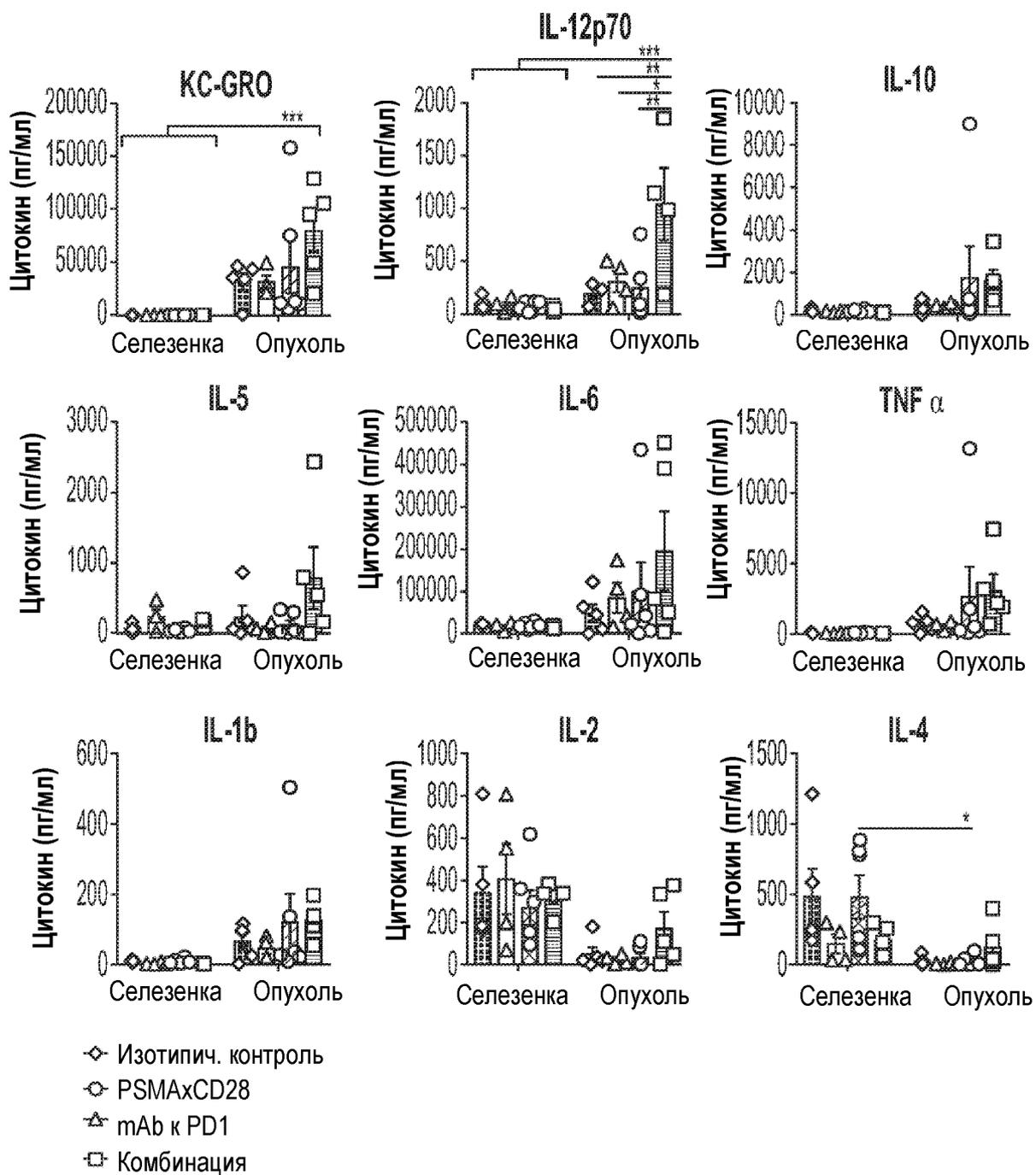
ФИГ. 22В



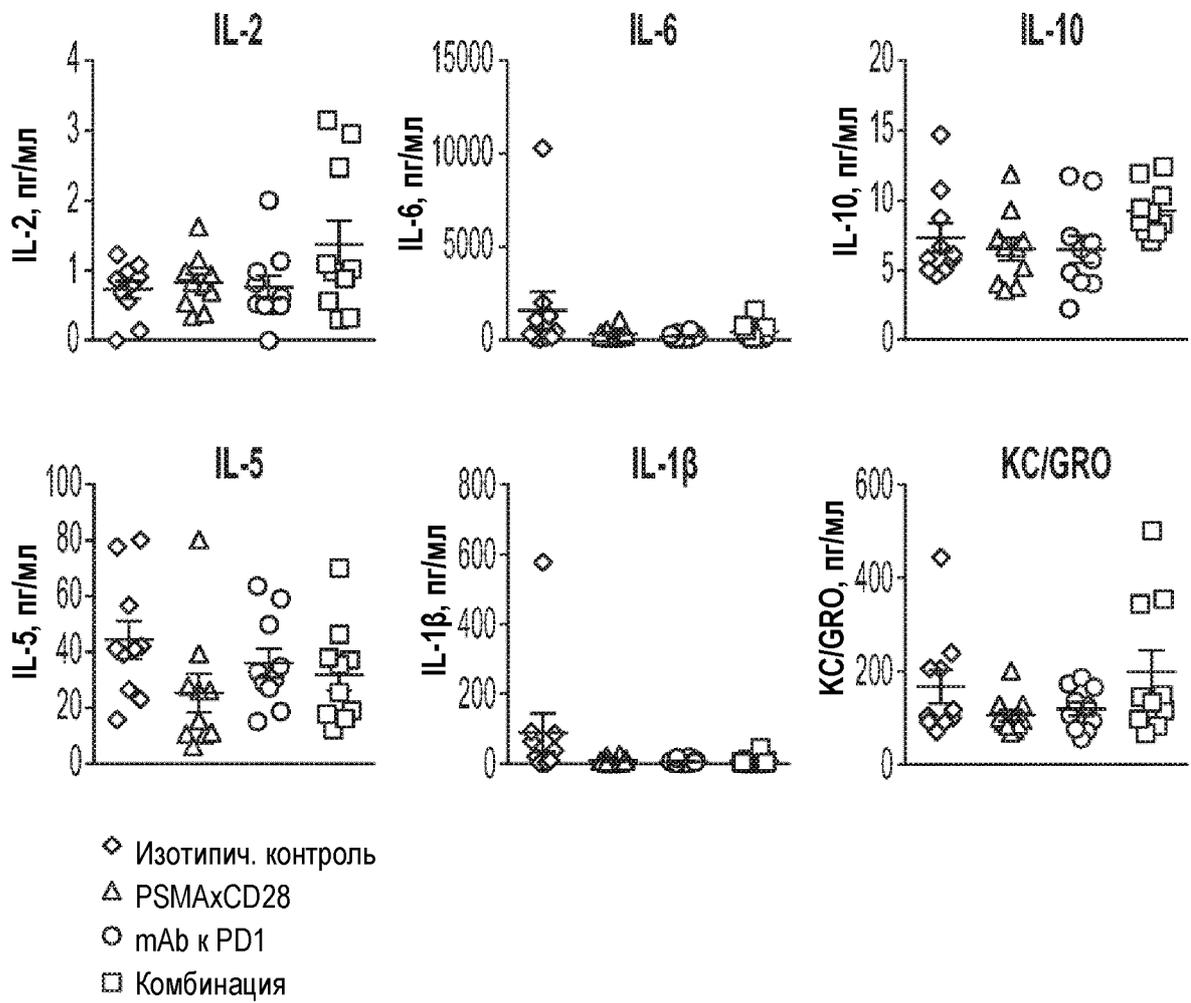
ФИГ. 22С



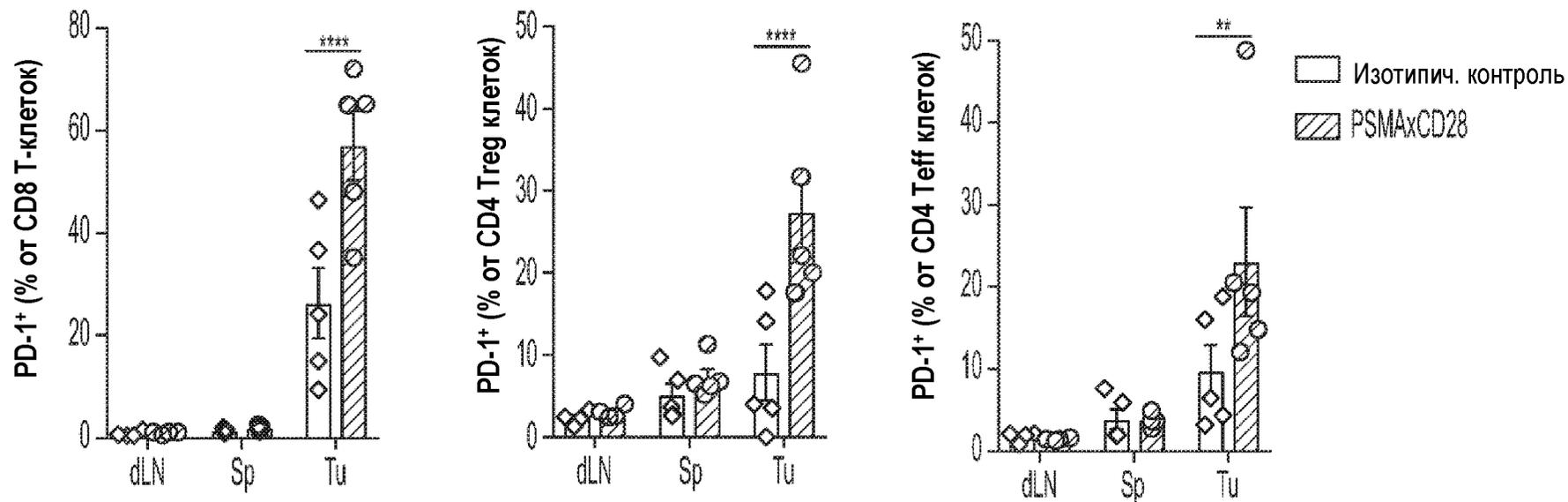
ФИГ. 22D



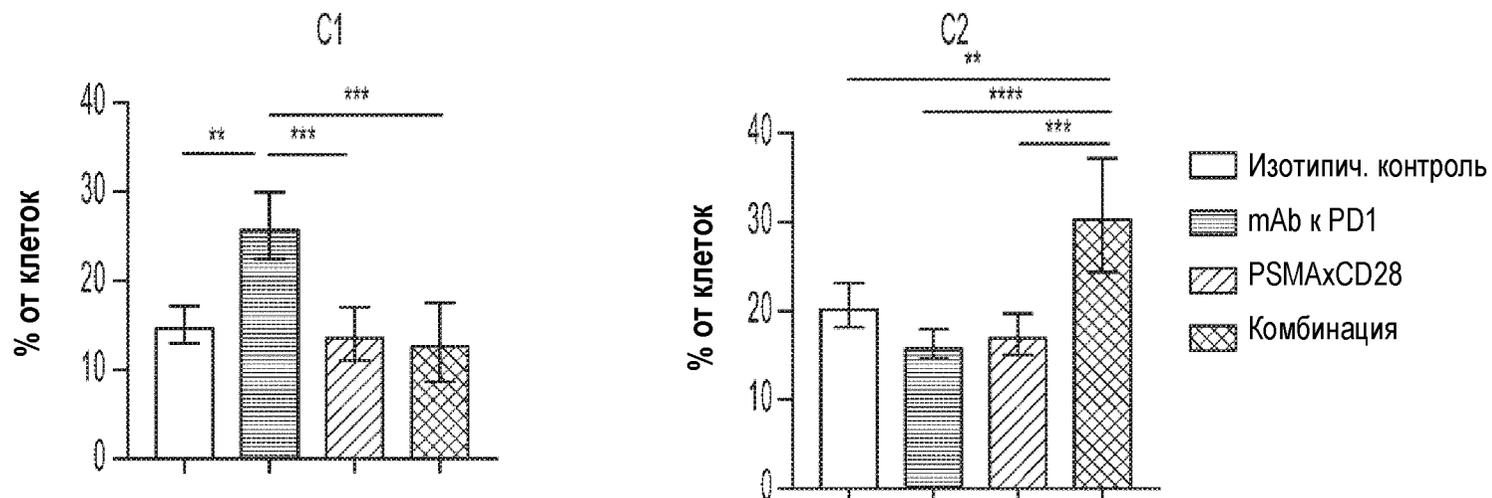
ФИГ. 23А



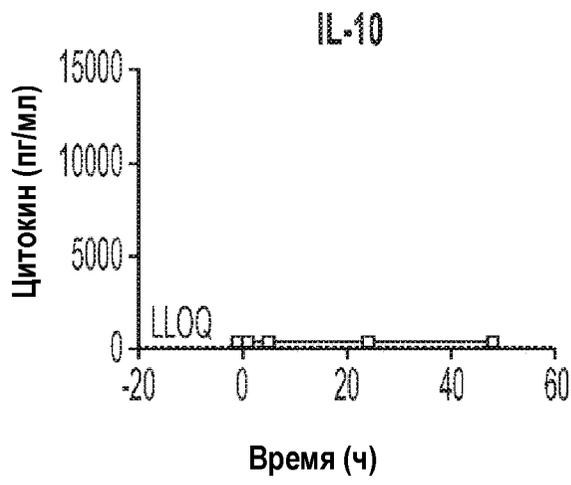
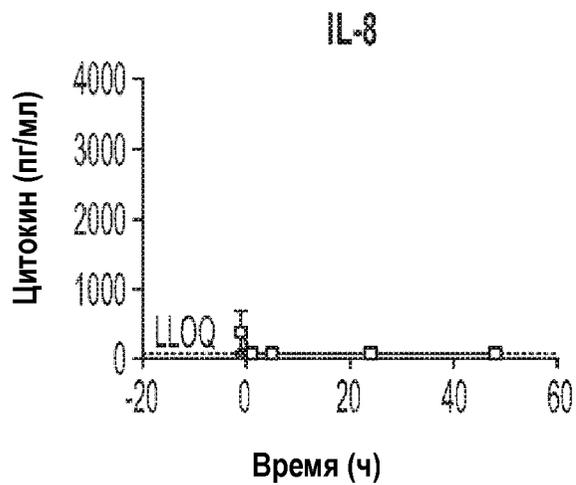
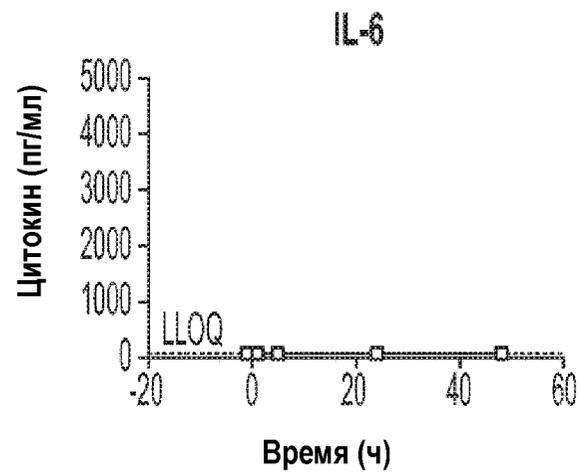
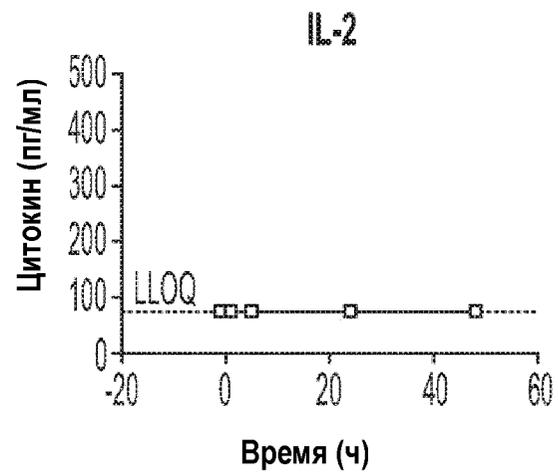
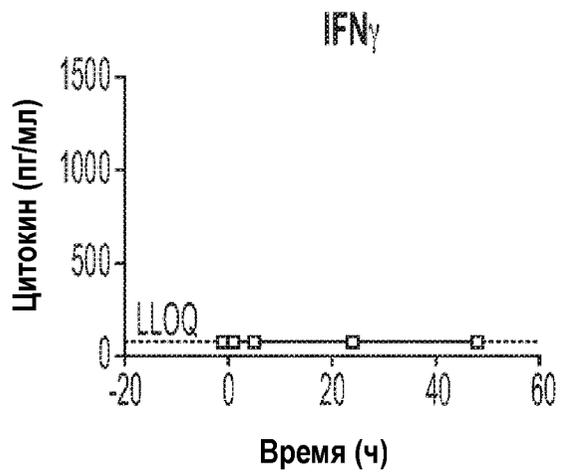
ФИГ. 23В



ФИГ. 24

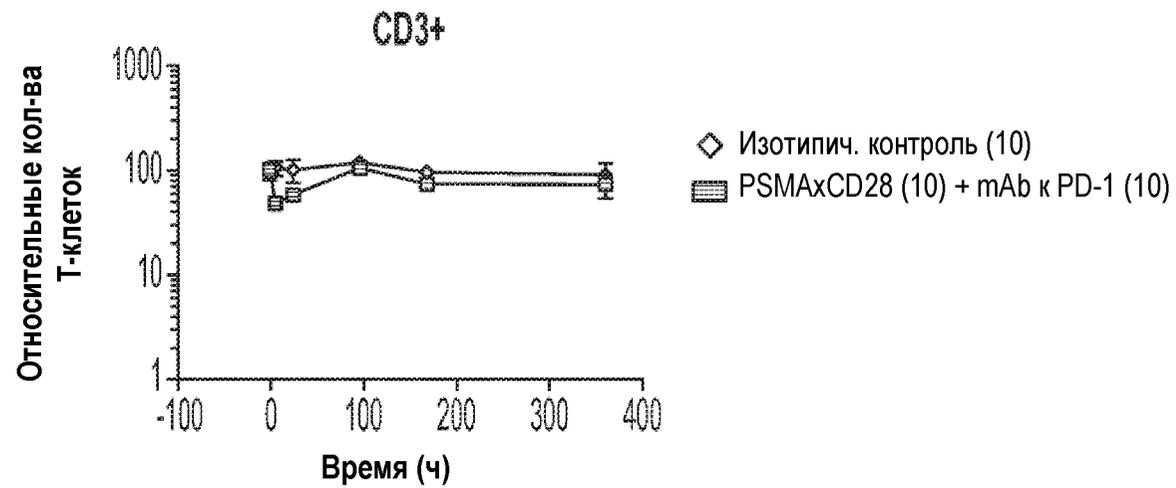


ФИГ. 25

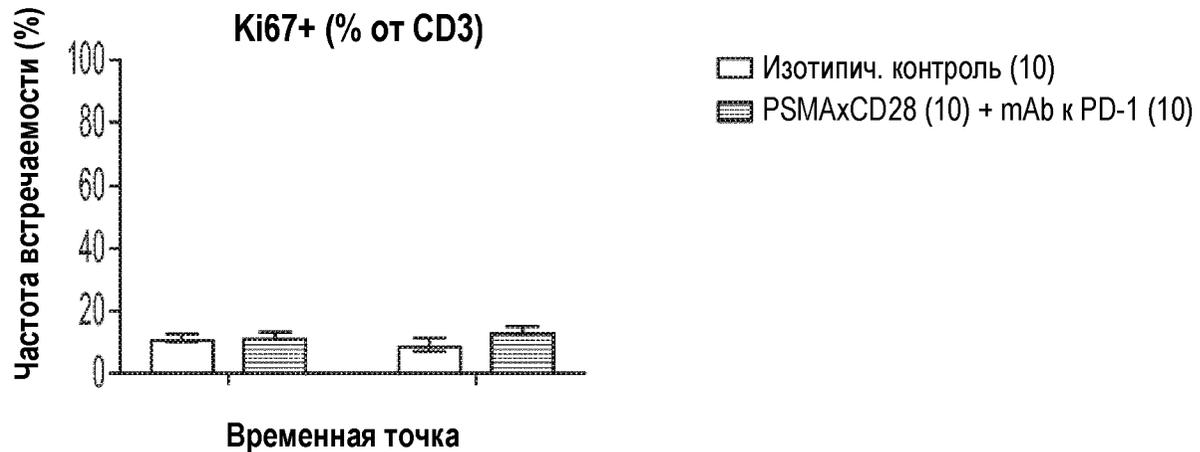
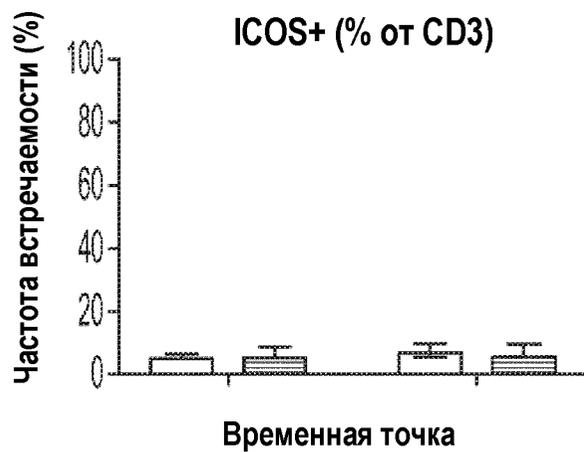


- ◆ Изотипич. контроль (10)
- PSMAxCD28 (10) + mAb к PD-1 (10)

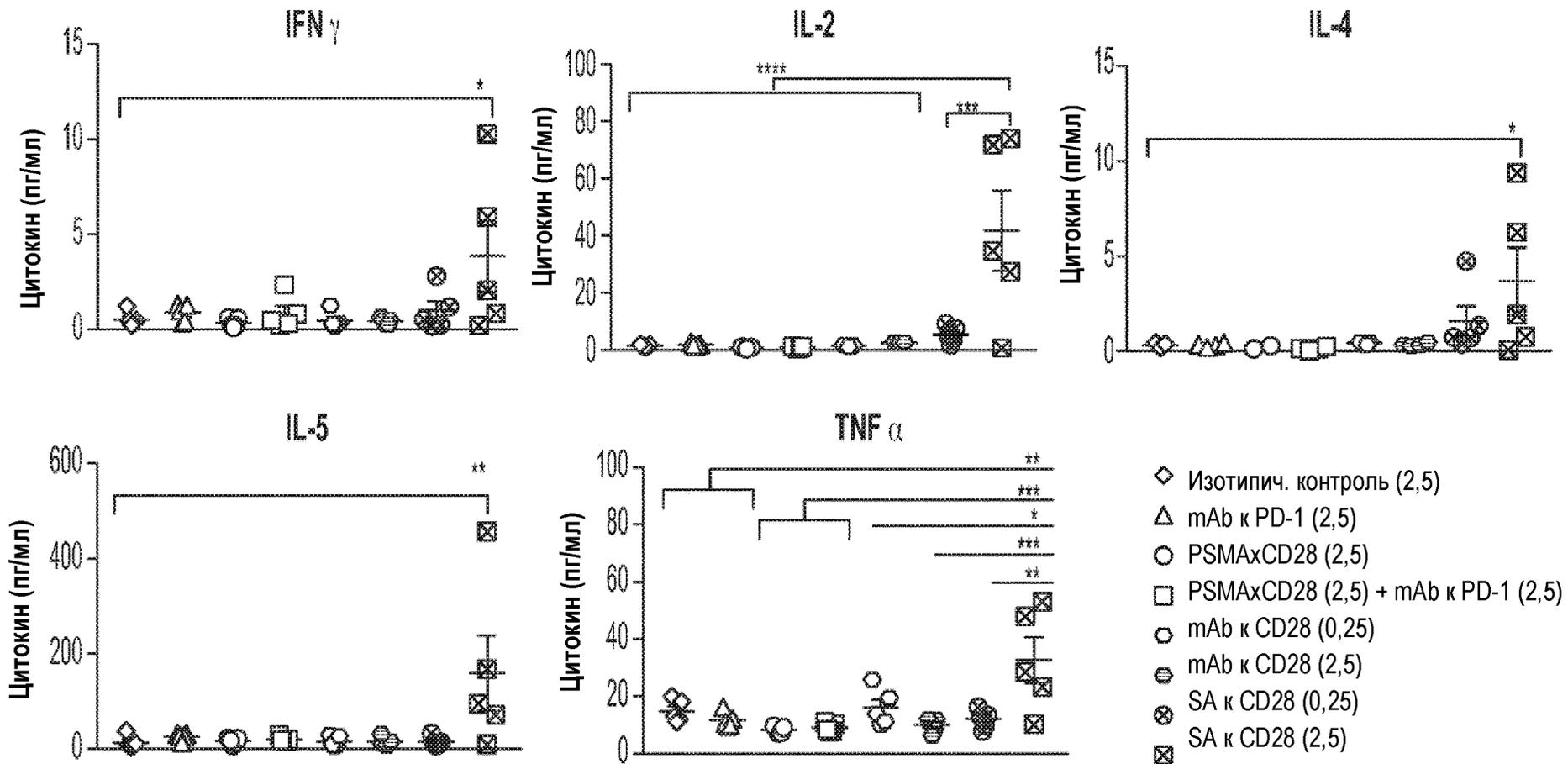
ФИГ. 26А



ФИГ. 26В



ФИГ. 26С



ФИГ. 27

bs16429D +/- PD1 НЕ ПОВЫШАЕТ СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ С ОПУХОЛЯМИ

—x— Изотипич. контроль

—o— PD1

—●— bs16429D

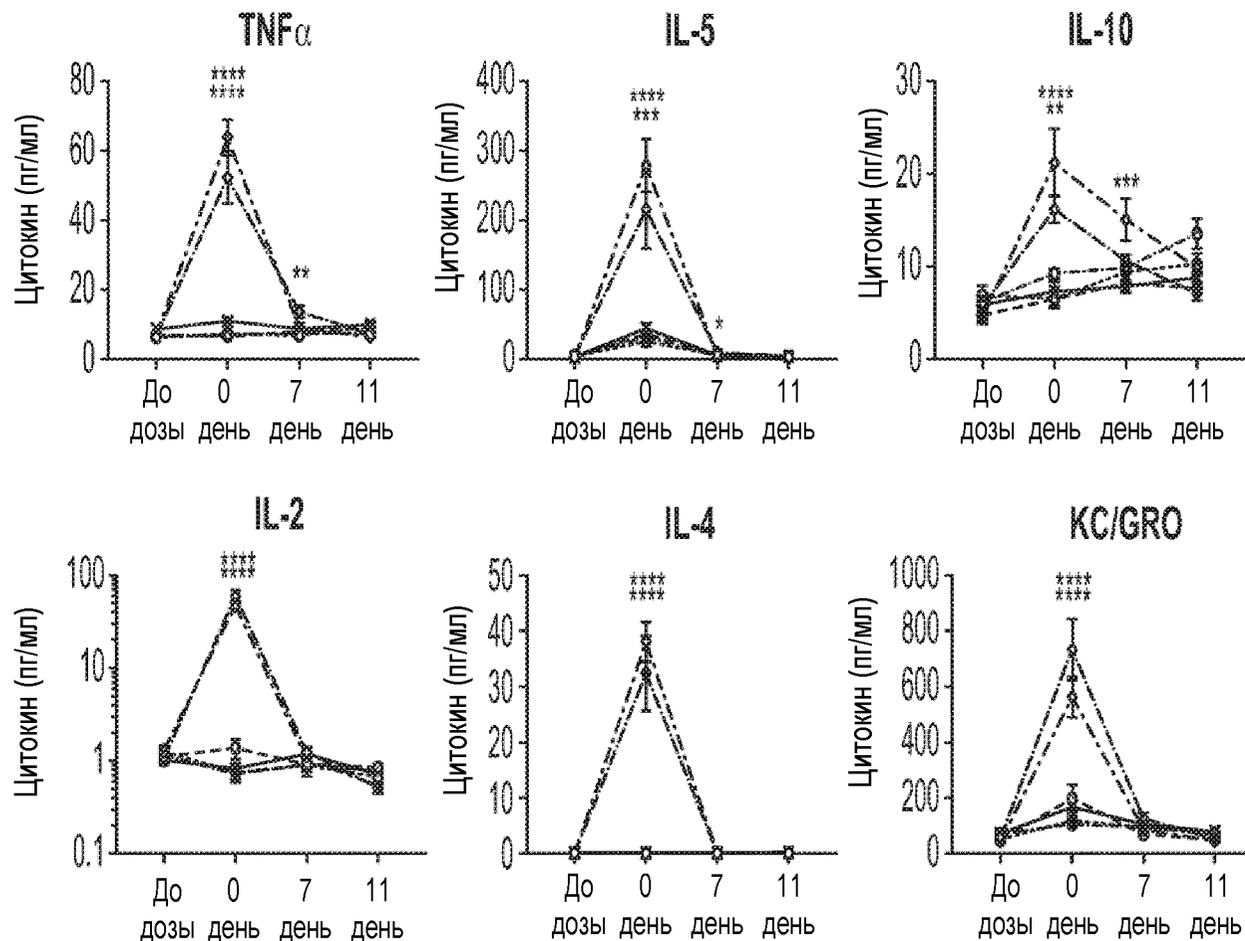
—●— bs16429D + PD1

—◇— PSMA x CD3

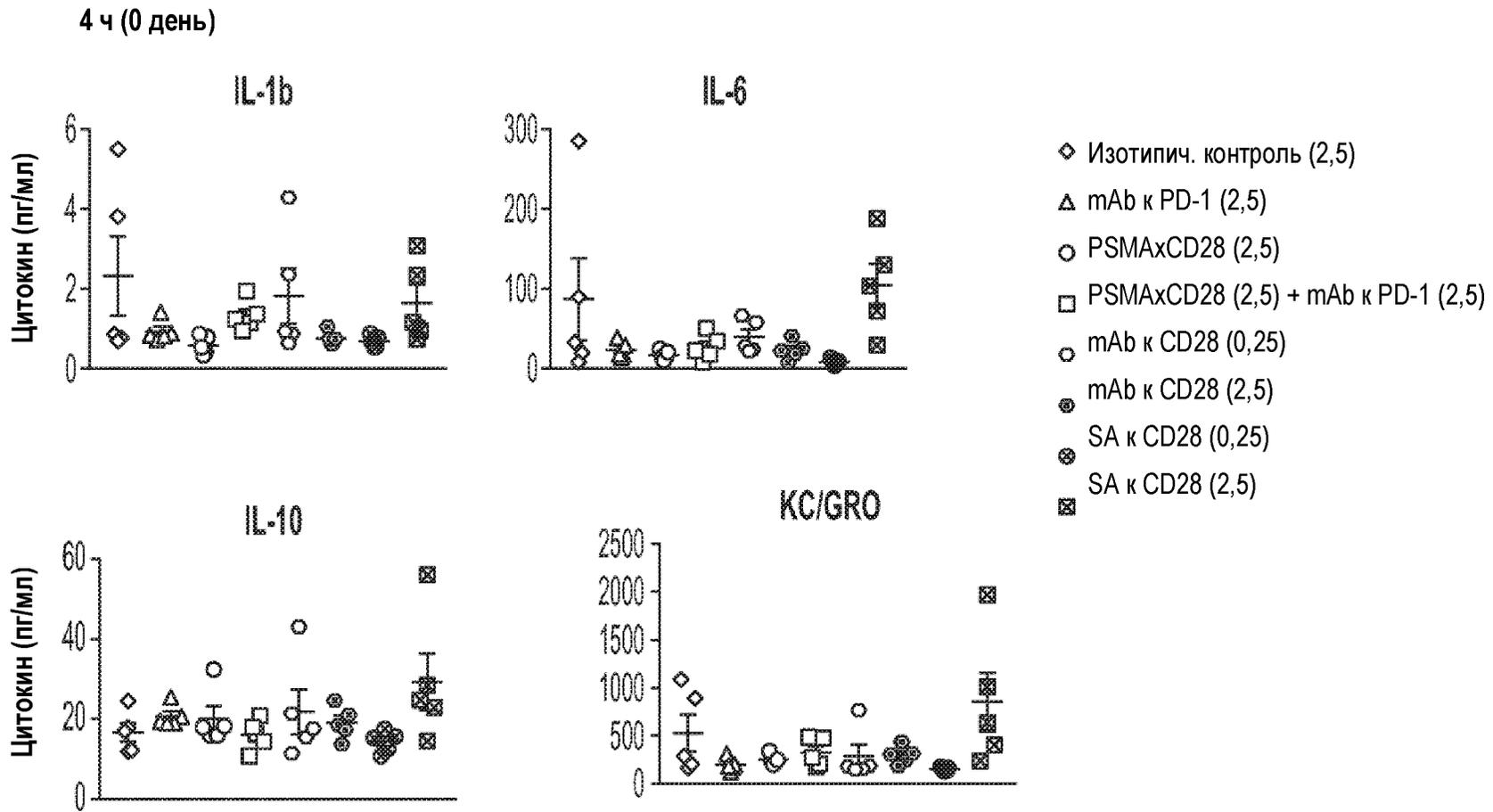
—◇— PSMA x CD3 + PD1

↑  
PSMA x CD3 +/- PD1

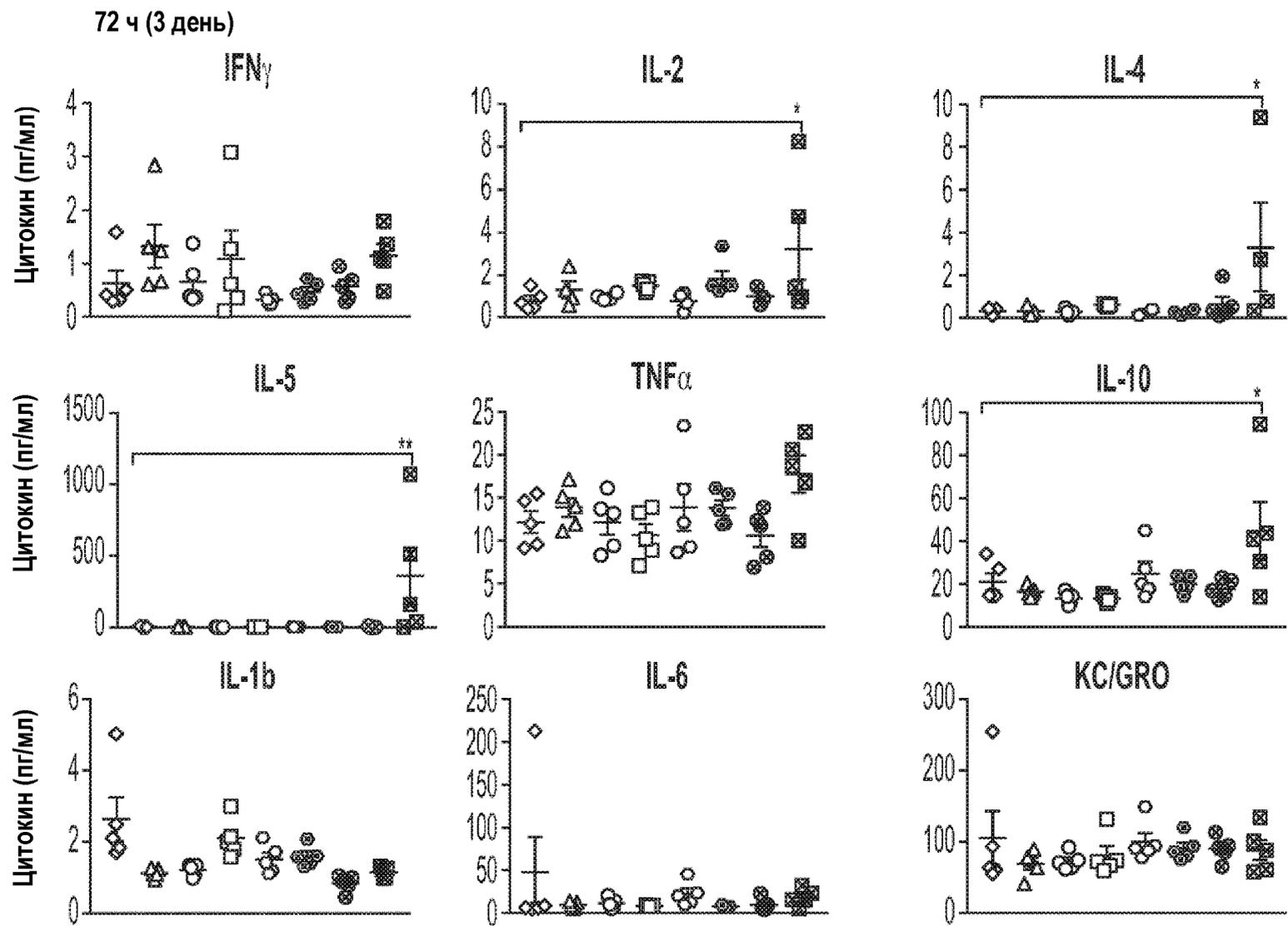
индуцирует цитокины



ФИГ. 28



ФИГ. 29А



ФИГ. 29В