



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.07.18

## (54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-ВСМА X АНТИ-CD3 АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/700,596; 62/750,968; 62/793,645

(72) Изобретатель:

(32) 2018.07.19; 2018.10.26; 2019.01.17

Смит Эрик, Олсон Кара, Дельфино

(33) US

Фрэнк, Дайлилло Дэвид, Киршнер

(86) PCT/US2019/042447

Джессика, Синешчекова Ольга, Чжан

(87) WO 2020/018820 2020.01.23

Цян (US)

(71) Заявитель:

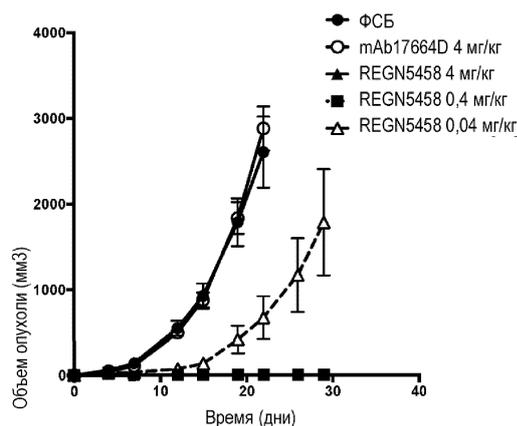
(74) Представитель:

РИДЖЕНЕРОН

Медведев В.Н. (RU)

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Антиген созревания В-лимфоцитов (ВСМА) экспрессируется на злокачественных плазматических клетках. Данное изобретение предлагает новые биспецифические антитела (bsAb), которые связываются как с ВСМА, так и с CD3, и активируют Т-лимфоциты через комплекс CD3 в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих ВСМА. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих ВСМА. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению полезны для лечения заболеваний и нарушений, при которых желателен и/или терапевтически полезен усиленный или индуцированный, нацеленный на ВСМА иммунный ответ. Например, биспецифические антитела согласно данному изобретению полезны для лечения различных видов рака, включая множественную миелому.



## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566731EA/22

### БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-ВСМА X АНТИ-CD3 АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0001]** Данная заявка включает в себя посредством ссылки Перечень последовательностей, поданный в машиночитаемой форме в виде файла 10452WO01-Sequence, созданного 8 июля 2019 года, и содержащего 63211 байт.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0002]** Данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфичны к антигену созревания В-лимфоцитов (ВСМА), и к способам их применения. Данное изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам (например, биспецифические антитела), которые связывают ВСМА и CD3, и способам их применения.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** Антиген созревания В-лимфоцитов (ВСМА), также известный как TNFRSF17 или CD269, представляет собой трансмембранный белок типа III, лишенный сигнального пептида и содержащий внеклеточный домен, богатый цистеином. ВСМА, наряду с близкородственными белками, способствует выживанию В-лимфоцитов на различных стадиях развития. ВСМА экспрессируется исключительно в клетках линии В-лимфоцитов, в частности в межфолликулярной области зародышевого центра, а также на плазмобластах и дифференцированных плазматических клетках. ВСМА избирательно индуцируется во время дифференцировки плазматических клеток и необходим для оптимального выживания долгоживущих плазматических клеток в костном мозге. При множественной миеломе ВСМА широко экспрессируется на злокачественных плазматических клетках на повышенных уровнях, а экспрессия ВСМА увеличивается по мере перехода от нормальных клеток к активной множественной миеломе. ВСМА также экспрессируется при других В-лимфоцитарных злокачественных новообразованиях, включая макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Беркитта и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. Tai et al., *Immunotherapy*, 7(11):1187-1199, 2015.

**[0004]** CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-лимфоцитах в ассоциации с рецепторным комплексом Т-лимфоцита (TCR), и необходим для активации Т-лимфоцитов. Функциональный CD3 формируется в результате димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эpsilon, дзета, дельта и гамма. Димерные структуры CD3 включают в себя гамма/эpsilon, дельта/эpsilon и дзета/дзета. Было показано, что антитела против CD3 образуют кластеры CD3 на Т-лимфоцитах, тем самым вызывая активацию Т-лимфоцитов аналогично вовлечению TCR молекулами МНС, нагруженными пептидами. Таким образом, анти-CD3 антитела были предложены для терапевтических целей, включая активацию Т-лимфоцитов. Кроме того, биспецифические антитела, способные связывать

CD3 и целевой антиген, были предложены для терапевтических применений, включая нацеливание иммунных ответов Т-лимфоцитов на ткани и клетки, экспрессирующие целевой антиген.

**[0005]** Антигенсвязывающие молекулы, которые нацелены на ВСМА, включая биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как ВСМА, так и CD3, могут быть полезны в терапевтических условиях, в которых желательным является специфическое нацеливание и опосредованное Т-лимфоцитами уничтожение клеток, экспрессирующих ВСМА.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** В одном аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген созревания В-лимфоцитов (ВСМА) человека на целевой опухолевой клетке с  $EC_{50}$  меньше чем около 100 нМ, как измерено с помощью *in vitro* анализа связывания FACS; и (b) второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает CD3 человека с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-6}$  М, как измерено с помощью *in vitro* анализа связывания FACS.

**[0007]** В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула активирует Т-лимфоциты *in vitro* с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-9}$  М. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула опосредует *in vitro* уничтожение Т-лимфоцитами линий опухолевых клеток, экспрессирующих ВСМА с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-9}$  М. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула опосредует *in vitro* уничтожение аутологичными Т-лимфоцитами первичных миеломных клеток, экспрессирующих ВСМА, с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-8}$  М. В вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула взаимодействует с аминокислотными остатками с 1 по 43 ВСМА, как указано в SEQ ID NO: 115.

**[0008]** В некоторых случаях, целевая опухолевая клетка представляет собой плазматическую клетку. В некоторых случаях, целевая опухолевая клетка принадлежит пациенту, страдающему множественной миеломой или другим В-лимфоцитарным нарушением, которое частично характеризуется наличием В-лимфоцитов, экспрессирующих ВСМА. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, экспрессирующих ВСМА, в дозе от около 0,04 мг/кг до около 4,0 мг/кг. В некоторых случаях, доза составляет 0,04 мг/кг, 0,4 мг/кг или 4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, дозу вводят пациенту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере два раза в неделю по меньшей мере в семи дозах. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию опухолевых клеток ВСМА+, выбранных из группы, состоящей из клеток миеломы, клеток лимфомы и клеток лейкемии. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию опухолевых клеток ВСМА+, выбранных из группы, состоящей из клеток H929, клеток MOLP-8 и клеток OPM.

**[0009]** В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула

перекрестно реагирует с ВСМА яванского макака. В некоторых случаях, биспецифическая антигенсвязывающая молекула не вступает в перекрестную реакцию с ВСМА яванского макака.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит: (а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который содержит: (а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 98; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 100; (b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102; и (c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (а) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96;

и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; или (b) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104; и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; или (b) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0012]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0013]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0014]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ВСМА человека, и содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 122 и 124, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 и 125; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88, 36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 и 68-70-72-84-86-88. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90/82 и 98/82.

**[0015]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая конкурирует за связывание с ВСМА или связывается с тем же эпитопом на ВСМА, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 90/82 или SEQ ID NO: 98/82.

**[0016]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая конкурирует за связывание с CD3 человека, или связывается с тем же эпитопом на CD3 человека, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 90/82 или SEQ ID NO: 98/82.

**[0017]** Любая из биспецифических антигенсвязывающих молекул, обсуждаемых выше или в данном документе, может представлять собой биспецифическое антитело. В некоторых случаях, биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека. В некоторых случаях, константная область тяжелой цепи IgG человека

представляет собой изотип IgG1. В некоторых случаях, константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG4. В различных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который снижает связывание рецептора Fc $\gamma$  по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

**[0018]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, биспецифическое антитело), обсуждаемую выше или в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

**[0019]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, биспецифическое антитело), обсуждаемую выше или в данном документе.

**[0020]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, обсуждаемую выше.

**[0021]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии, обсуждаемый выше.

**[0022]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает способ ингибирования роста опухоли из плазматических клеток у субъекта, включающий в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы или фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, как обсуждалось выше или в данном документе. В некоторых случаях, опухоль из плазматических клеток представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях, способ дополнительно включает в себя введение второго терапевтического агента, или схему лечения. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит противоопухолевый агент (например, химиотерапевтические агенты, включая мелфалан, винкристин (Oncovin), циклофосфамид (Cytoxan), этопозид (VP-16), доксорубин (Adriamycin), липосомальный доксорубин (Doxil), обендамустин (Treanda), или любые другие препараты, которые, как известно, эффективны при лечении опухолей из плазматических клеток у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит стероиды. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит целевые терапевтические средства, включая талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые являются препаратами, одобренными для лечения вновь диагностированных пациентов. Леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиностат, иксазомиб, элтузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического агента, эффективного для лечения рецидивирующей миеломы. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент представляет собой схему, включающую в себя лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, второй

терапевтический агент может представлять собой ингибитор протеасом, включая бортезомиб (Velcade), карфилзомиб (Kyprolis), иксазомиб (Ninlaro). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Farydak). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки, или их комбинации.

**[0023]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает способ лечения пациента, страдающего от множественной миеломы или другого В-лимфоцитарного злокачественного новообразования с экспрессией ВСМА, где способ включает в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы или фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, как обсуждалось выше или в данном документе. В некоторых случаях, В-лимфоцитарное злокачественное новообразование с экспрессией ВСМА, выбирают из группы, состоящей из: макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы Беркитта и диффузной крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы маргинальной зоны, лимфоплазмоцитарной лимфомы и лимфомы Ходжкина. В некоторых случаях, способ дополнительно включает в себя введение второго терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент включает в себя: противоопухолевый агент (химиотерапевтический агент), ДНК-алкиляторы, иммуномодуляторы, ингибиторы протеасом, ингибиторы гистондеацетилазы, лучевую терапию, трансплантат стволовых клеток, иммуномодулятор, моноклональное антитело, которое взаимодействует с антигеном, экспрессируемом на поверхности опухолевых клеток, моноклональное антитело, отличное от описанных в данном документе, которое может взаимодействовать с другим антигеном на поверхности плазматических клеток, биспецифическое антитело, которое имеет одно плечо, которое связывается с антигеном на поверхности опухолевых клеток, и другое плечо, которое связывается с антигеном на Т-лимфоците, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки, например, тот, который нацелен на PD-1 или CTLA-4, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda), ниволумаб (Opdivo) или цемиплимаб (REGN2810). В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio) или дурвалумаб (Imfinzi)). В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов CTLA-4, таких как ипилимумаб (Yervoy). Другие комбинации, которые можно использовать вместе с антителом согласно данному изобретению,

описаны выше.

**[0024]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает способ лечения пациента, страдающего от опухоли, экспрессирующей ВСМА, при этом способ включает в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, как обсуждалось выше или в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей таковую, в комбинации с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых случаях, анти-PD-1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-PD-1 антитело. В некоторых вариантах осуществления, указанное анти-PD-1 антитело представляет собой цемиплимаб (REGN2810). В различных вариантах осуществления, комбинация анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифической антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифического антитела) и анти-PD-1-антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, анти-PD-1-антитела) оказывает синергетический терапевтический эффект при лечении опухолей, экспрессирующих ВСМА.

**[0025]** В другом аспекте, данное изобретение предлагает применение биспецифических антигенсвязывающих молекул, обсуждаемых выше или в данном документе, или фармацевтических композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, при лечении заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА. В некоторых случаях, заболевание или нарушение представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях, заболевание или нарушение представляет собой болезнь Кастлемана. В некоторых случаях, антигенсвязывающие молекулы предназначены для применения в комбинации с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, при этом необязательно анти-PD-1 антитело представляет собой цемиплимаб (REGN2810).

**[0026]** Данное изобретение дополнительно предлагает использование биспецифических антигенсвязывающих молекул, обсуждаемых выше или в данном документе, в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА. В некоторых случаях, заболевание или нарушение представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой множественную миелому.

**[0027]** В различных вариантах осуществления, любые из признаков или компонентов вариантов осуществления, обсуждаемых выше или в данном документе, могут быть скомбинированы, и такие комбинации входят в объем данного изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или в данном документе, может быть скомбинировано с другим связанным значением, обсуждаемым выше или в данном документе, чтобы указать диапазон со значениями, представляющими верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны входят в объем данного изобретения.

**[0028]** Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0029]** Фиг. 1 и 2 иллюстрируют профилактическое дозозависимое опухолевое ингибирование ВСМА-экспрессирующих опухолевых клеток NCI-H929 множественной миеломы человека *in vivo* с помощью анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител REGN5458 и REGN5459, соответственно. Клетки NCI-H929 экспрессируют высокие уровни ВСМА.

**[0030]** Фиг. 3 и 4 иллюстрируют терапевтическое дозозависимое опухолевое ингибирование устоявшихся ВСМА-экспрессирующих опухолевых клеток NCI-H929 множественной миеломы человека *in vivo* с помощью анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител REGN5458 и REGN5459, соответственно. Клетки NCI-H929 экспрессируют высокие уровни ВСМА.

**[0031]** Фиг. 5 и 6 иллюстрируют профилактическое дозозависимое опухолевое ингибирование ВСМА-экспрессирующих опухолевых клеток MOLP-8 множественной миеломы человека *in vivo* с помощью анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител REGN5458 и REGN5459, соответственно. Клетки MOLP-8 экспрессируют умеренные уровни ВСМА.

**[0032]** Фиг. 7 иллюстрирует терапевтическое уменьшение устоявшейся опухолевой нагрузки ВСМА-экспрессирующих опухолевых клеток OPM-2 множественной миеломы человека *in vivo* с помощью анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител REGN5458 и REGN5459, относительно контролей. Клетки OPM-2 экспрессируют низкие уровни ВСМА.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0033]** Прежде чем будет описано данное изобретение, следует понять, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

**[0034]** Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. В контексте данного документа, термин «около» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не больше чем на 1%. Например, в контексте данного документа, выражение «около 100» включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

**[0035]** Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться при практическом применении или испытании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в данном документе. Все патенты, заявки и непатентные публикации,

упомянутые в этом описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

### **Определения**

**[0036]** Выражение «CD3», в контексте данного документа, относится к антигену, который экспрессируется на Т-лимфоцитах как часть мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (TCR), и который состоит из гомодимера или гетеродимера, сформированного ассоциацией двух из четырех рецепторных цепей: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 116; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 117; CD3-дзета человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118; и CD3-гамма содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат виду, отличному от человека. Таким образом, выражение «CD3» обозначает человеческий CD3, если не указано, что он принадлежит виду, отличному от человека, например, «CD3 мыши», «CD3 обезьяны» и т. д.

**[0037]** В контексте данного документа, термин «антитело, связывающее CD3» или «анти-CD3 антитело» включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну субъединицу CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD3 (например, димеры гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета CD3). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или CD3, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый CD3 включает в себя природные белки CD3, а также рекомбинантные варианты белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом отсоединены от клеточной мембраны.

**[0038]** В контексте данного документа выражение «CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности» означает один или большее количество белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка CD3 экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает в себя белки CD3, содержащиеся в окружении функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение «CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает в себя белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета CD3). Выражение «CD3, экспрессируемый на клеточной

поверхности» также включает в себя цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе, без других типов цепей CD3, на поверхности клетки. «CD3, экспрессируемый на поверхности клетки» может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. В альтернативном варианте, «CD3, экспрессируемый на поверхности клетки» может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD3 человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD3 на своей поверхности.

**[0039]** Выражение «BCMA», в контексте данного документа, относится к антигену созревания В-лимфоцитов. BCMA (также известный как TNFRSF17 и CD269) представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый на злокачественных плазматических клетках, и играет центральную роль в регулировании созревания и дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулины. Аминокислотная последовательность BCMA человека представлена в SEQ ID NO: 115, и также может быть найдена под номером доступа NP\_001183.2 в GenBank.

**[0040]** В контексте данного документа, термин «антитело, связывающее BCMA» или «анти-BCMA антитело» включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают BCMA.

**[0041]** Термин «антигенсвязывающая молекула» включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

**[0042]** Термин «антитело», в контексте данного документа, обозначает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, BCMA или CD3). Термин «антитело» включает в себя молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Термин «антитело» также включает в себя молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L</sub>1). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями,

называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL 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 данного изобретения, FR анти-BCMA антитела или анти-CD3 антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или большего количества CDR.

**[0043]** Термин «антитело», в контексте данного документа, также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и тому подобное, в контексте данного документа, включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с формированием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической 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, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенировано и обработано химически, или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или большего количества переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для внесения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

**[0044]** Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv(scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», в контексте данного документа.

**[0045]** Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по

меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или большим количеством каркасных последовательностей. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих  $V_H$ -домен, ассоциированный с  $V_L$ -доменом,  $V_H$ - и  $V_L$ -домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный  $V_H$ - или  $V_L$ -домен.

**[0046]** В некоторых 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 быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно данному изобретению, включают в себя: (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 прямо соединены друг с другом, или могут быть соединены полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что дает гибкую или полугибкую связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или большим количеством мономерных  $V_H$ - или  $V_L$ -доменов (например, с помощью дисульфидной (дисульфидных) связи (связей)).

**[0047]** Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два различных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в данном документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно данному изобретению с использованием рутинных методов, доступных в данной области.

**[0048]** Антитела согласно данному изобретению могут функционировать через комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ). «Комплементзависимая цитотоксичность» (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток с помощью антитела согласно изобретению в присутствии комплемента. «Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксичные клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки натуральные киллеры (НК), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанные антитела на целевой клетке и тем самым приводят к лизису целевой клетки. 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 клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

**[0049]** В некоторых вариантах осуществления, анти-BCMA моноспецифические антитела или анти-BCMA х анти-CD3 биспецифические антитела согласно данному изобретению являются антителами человека. Термин «антитело человека», в контексте данного документа, предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, внесенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако, термин «антитело человека», в контексте данного документа, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были встроены в каркасные последовательности человека.

**[0050]** Антитела согласно данному изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления изобретения, представлять собой рекомбинантные антитела человека. Термин «рекомбинантное антитело человека», в контексте данного документа, предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое трансгенно для генов иммуноглобулинов 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 генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако, в некоторых вариантах осуществления, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют трансгенное животное для последовательностей Ig человека, соматический мутагенез *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 связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

**[0051]** Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой примерно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и формируется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

**[0052]** Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничивается структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или большее количество мутаций в шарнирной,  $C_H2$  или  $C_H3$  области, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

**[0053]** Антитела согласно данному изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело», в контексте данного документа, обозначает 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» для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам

осуществления, выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

**[0054]** Данное изобретение также включает в себя одноплечевые антитела, которые связывают ВСМА. В контексте данного документа термин «одноплечевое антитело» обозначает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела согласно данному изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в Таблице 1.

**[0055]** Анти-ВСМА или анти-ВСМА х анти-CD3 антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко определены путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, в которых одна или больше аминокислот в одной или больше каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как мутации зародышевой линии). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все каркасные и/или CDR-остатки в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления, только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или большее количество каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было первоначально получено). Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую

комбинацию двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или большее количество желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность и др. Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в данное изобретение.

**[0056]** Данное изобретение также включает в себя анти-BCMA или анти-BCMA x анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или большим количеством консервативных замен. Например, данное изобретение включает в себя анти-BCMA или анти-BCMA x анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т. д. аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в Таблице 1 и 3 в данном документе, или анти-CD3 антител, раскрытых в WO 2014/047231 или WO 2017/053856, каждый включен в данный документ посредством ссылки.

**[0057]** Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом, в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь больше чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

**[0058]** Термин «значительная идентичность» или «по сути идентичный», при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере около 95% и более предпочтительно

по меньшей мере около 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

**[0059]** Применительно к полипептидам термин «значительное сходство» или «по сути аналогичный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют последовательность, идентичную по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% или 99%. Предпочтительно, позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой таковую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или большее количество аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить 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, включен в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают в себя: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) 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 альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включен в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

**[0060]** Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют

идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными 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, используя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 and Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

#### Мутации зародышевой линии

**[0061]** Анти-CD3 антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

**[0062]** Данное изобретение также включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, в которых одна или большее количество аминокислот в одной или больше каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как мутации зародышевой линии), и имеющие слабое или не детектируемое связывание с антигеном CD3.

**[0063]** Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или большего количества мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности

зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или большее количество желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, слабую или уменьшенную аффинность связывания, улучшенные или усиленные фармакокинетические свойства, сниженная иммуногенность и др. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, согласно инструкциям, предоставляемым данным изобретением, находятся в пределах объема данного изобретения.

**[0064]** Данное изобретение также включает в себя антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, при сохранении или улучшении желаемой слабой аффинности к антигену CD3. Применительно к аминокислотным последовательностям термин «значительное сходство» или «по сути аналогичный» означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют идентичность, составляющую по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно, позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или большее количество аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить 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.

**[0065]** Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными 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, используя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 and Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

#### Связывающие свойства антител

**[0066]** В контексте данного документа, термин «связывание» в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела, или Fc-содержащего белка с любым, например, заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, обычно относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген.

**[0067]** Например, аффинность связывания обычно соответствует значению  $K_d$  около  $10^{-7}$  М или меньше, например около  $10^{-8}$  М или меньше, например около  $10^{-9}$  М или меньше, при определении, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в приборе ВΙΑcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда, и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антилиганда). Также обычно используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания с сортировкой флуоресцентно-активируемых клеток (FACS), и данные FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолигандов и ППР (Benedict, CA, *J Immunol Methods.* 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods.* 2005, 302(1-2):68-77).

**[0068]** Соответственно, антитело или антигенсвязывающий белок согласно данному изобретению связывается с заранее определенным антигеном или молекулой (рецептором) клеточной поверхности, имеющее(щий) аффинность, соответствующую значению  $K_d$ , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин). Согласно данному изобретению аффинность антитела, соответствующая значению  $K_d$ , которое равно или меньше чем в десять раз ниже, чем для неспецифического антигена, может рассматриваться как необнаруживаемое связывание, однако такое антитело может быть спарено с вторым антигенсвязывающим плечом для продукции биспецифического антитела согласно данному изобретению.

**[0069]** Термин « $K_d$ » (М) относится к константе равновесия при диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе равновесия при диссоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела с антигеном.

Существует обратная зависимость между  $K_d$  и аффинностью связывания, поэтому чем меньше значение  $K_d$ , тем выше, то есть сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению  $K_d$ , и, наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, большему значению  $K_d$ . В некоторых случаях, более высокая аффинность связывания (или  $K_d$ ) конкретной молекулы (например, антитела) к ее взаимодействующей молекуле-партнеру (например, антигену X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) к другой взаимодействующей молекуле-партнеру (например, антигену Y) может быть выражена как отношение связывания, определяемое делением большего значения  $K_d$  (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее  $K_d$  (более высокая или более сильная аффинность), например, выраженное как в 5-раз или 10-раз больше аффинности связывания, в зависимости от обстоятельств.

**[0070]** Термин « $k_d$ » ( $s^{-1}$  или  $1/s$ ) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе скорости диссоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Указанное значение также называется значением  $k_{off}$ .

**[0071]** Термин « $k_a$ » ( $M^{-1} \times s^{-1}$  или  $1/M$ ) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе скорости ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела.

**[0072]** Термин « $K_A$ » ( $M^{-1}$  или  $1/M$ ) относится к константе равновесия при ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или константе равновесия при ассоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Константу равновесия при ассоциации получают делением  $k_a$  на  $k_d$ .

**[0073]** Термин «EC50» или « $EC_{50}$ » относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает в себя концентрацию антитела, которая индуцирует ответ наполовину между исходным значением и максимумом после указанного времени воздействия.  $EC_{50}$  по существу представляет собой концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления, значение  $EC_{50}$  равно концентрации антитела согласно данному изобретению, которая дает половину от максимального связывания с клетками, экспрессирующими CD3 или ассоциированный с опухолью антиген (например, BCMA), как определено, например, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при повышенном  $EC_{50}$  или половине максимальной эффективной концентрации.

**[0074]** В одном варианте осуществления, сниженное связывание можно определить как повышенную концентрацию антитела  $EC_{50}$ , которая обеспечивает связывание с половиной максимального количества целевых клеток.

**[0075]** В другом варианте осуществления, значение  $EC_{50}$  представляет собой

концентрацию антитела согласно данному изобретению, которая вызывает истощение половины целевых клеток от максимального количества посредством цитотоксической активности Т-лимфоцитов. Таким образом, повышенная цитотоксическая активность (например, опосредованное Т-лимфоцитами уничтожение опухолевых клеток) наблюдается при пониженном значении  $EC_{50}$  или половине максимальной эффективной концентрации.

#### **Биспецифические антигенсвязывающие белки**

**[0076]** Указанные антитела согласно данному изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного целевого полипептида, или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к больше чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Анти-BCMA моноспецифические антитела или анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела согласно данному изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связан (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или большим количеством других молекулярных объектов, таких как другое антитело или фрагмент антитела, в целях получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

**[0077]** Подразумевается, что использование выражения «анти-CD3 антитело» или «анти-BCMA антитело» в данном документе включает в себя как моноспецифические анти-CD3 или анти-BCMA антитела, так и биспецифические антитела, содержащие CD3-связывающее плечо и BCMA-связывающее плечо. Таким образом, данное изобретение включает в себя биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает CD3 человека, а другое плечо иммуноглобулина специфично к BCMA человека. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в Таблице 3 в данном документе, или анти-CD3 антитела, раскрытого в WO 2014/047231 или WO 2017/053856.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления, CD3-связывающее плечо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-лимфоцитов человека. В некоторых вариантах осуществления, CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-лимфоцитов человека. В других вариантах осуществления, CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует гибель клеток, экспрессирующих антиген, ассоциированный с опухолью, в контексте биспецифического или мультиспецифического антитела. В других вариантах осуществления, CD3-связывающее плечо слабо связывается или соединяется с CD3 человека и яванского макака (обезьяны), однако связывающее взаимодействие не

обнаруживается с помощью анализов *in vitro*, известных в данной области техники. ВСМА-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в Таблице 1 в данном документе.

**[0079]** Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления, данное изобретение включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и ВСМА. Такие молекулы могут называться в данном документе, например, «анти-ВСМА х, анти-CD3» или «анти-CD3/анти-ВСМА», или «анти-CD3хВСМА», или «CD3хВСМА» биспецифические молекулы, или обозначатся другой подобной терминологией (например, анти-ВСМА/анти-CD3).

**[0080]** Термин «ВСМА», в контексте данного документа, относится к белку ВСМА человека, если не указано, что он происходит из отличного от человека вида (например, «ВСМА мыши», «ВСМА обезьяны» и т. д.). Белок ВСМА человека имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 115.

**[0081]** Вышеуказанные биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и ВСМА, могут содержать анти-CD3 антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD3 со слабой аффинностью связывания, например демонстрируя  $K_d$  больше, чем около 40 нМ, как измерено в *in vitro* анализе аффинности связывания.

**[0082]** В контексте данного документа, выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий из по меньшей мере одной определяющей комплементарность области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одной или большим количеством дополнительных CDR и/или каркасных областей (FR), специфически связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определены в другом месте в данном документе.

**[0083]** В контексте данного документа, выражение «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая одна или в комбинации с одной или большим количеством дополнительных CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте данного изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, ВСМА), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отличающийся антиген (например, CD3).

**[0084]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического

антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домены (например, биспецифическое антитело), 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 упоминаться в данном документе как D1-HCDR1, D1-HCDR2 и D1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут упоминаться в данном документе как D2-HCDR1, D2-HCDR2 и D2-HCDR3.

**[0085]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (b) три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0086]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 98; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 100; (b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102; и (c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104. В

некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (a) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96; и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; или (b) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104; и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит: (a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; или (b) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0087]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0088]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ

ID NO: 84, 86, 88. В некоторых случаях, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

**[0089]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ВСМА человека, и содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 122 и 124, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 и 125; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88, 36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 и 68-70-72-84-86-88. В некоторых случаях, первый антигенсвязывающий домен содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82. В некоторых случаях, второй антигенсвязывающий домен содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90/82 и 98/82.

**[0090]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула конкурирует за связывание с ВСМА или связывается с тем же эпитопом на ВСМА, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности либо SEQ ID NO: 90/82, либо SEQ ID NO: 98/82.

**[0091]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула конкурирует за связывание с CD3 человека или связывается с тем же эпитопом на CD3 человека, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82

и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности либо SEQ ID NO: 90/82, либо SEQ ID NO: 98/82.

**[0092]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, обсуждаемые выше или в данном документе, могут представлять собой биспецифические антитела. В некоторых случаях, биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека. В некоторых случаях, константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG1. В некоторых случаях, константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG4. В различных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который снижает связывание рецептора Fc $\gamma$  по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

**[0093]** Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или косвенно соединены друг с другом с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению. В альтернативном варианте, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен каждый может быть соединен с отдельным мультимеризующим доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым формируя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. В контексте данного документа, термин «мультимеризующий домен» обозначает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая имеет способность связываться со вторым мультимеризующим доменом такой же или подобной структуры, или состава. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H3</sub> иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>), например, Fc-домен IgG, выбранного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой изотипной группе.

**[0094]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению обычно содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых отдельно является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут быть одинакового изотипа IgG, такие как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В альтернативном варианте, первый и второй мультимеризующие домены могут быть разных изотипов IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления, мультимеризующий домен представляет собой фрагмент Fc или аминокислотную последовательность длиной от 1 до около 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления, мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают в себя пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива спираль-спираль.

**[0096]** Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению может использоваться любой формат или технология биспецифических антител. Например, антитело или его фрагмент, имеющее(щий) первую специфичность связывания антигена, может быть функционально связано(зан) (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или большим количеством других молекулярных объектов, таких как другое антитело или фрагмент антитела, имеющее(щий) вторую специфичность связывания антигена, для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Специальные иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, включают в себя, без ограничения: например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, гибриды IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-в-отверстия, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-в-отверстия и т. п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в нем, для обзора вышеупомянутых форматов).

**[0097]** В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению мультимеризующие домены, например, Fc-домены, могут содержать одну или большее количество аминокислотных изменений (например, вставки, делеции или замены) по сравнению встречающейся в природе версией домена Fc дикого типа. Например, изобретение включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или большее количество модификаций в Fc-домене, что дает модифицированный Fc-домен, имеющий модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, при этом модификация увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в позиции 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает в себя модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); 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).

**[0098]** Данное изобретение также включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C<sub>H</sub>3 и второй домен C<sub>H</sub>3 Ig,

при этом первый и второй домены  $C_{H3}$  Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой и при этом разница по меньшей мере по одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным разницы по аминокислоте. В одном варианте осуществления, первый домен Ig  $C_{H3}$  связывает белок А, а второй домен  $C_{H3}$  Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификацию H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй  $C_{H3}$  может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., например, патент США № 8586713. Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены в пределах второго  $C_{H3}$ , включают в себя: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N, и V82I (IMGT; N384S, K392N, и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, и V422I согласно EU) в случае антител IgG4.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления, домен Fc может быть химерным, объединяя последовательности Fc, происходящие из больше чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный домен Fc может содержать часть или всю последовательность  $C_{H2}$ , полученную из области  $C_{H2}$  IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность  $C_{H3}$ , полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный домен Fc может также содержать химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать последовательность «верхнего шарнира», полученную из области шарнира IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью «нижнего шарнира», полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [ $C_{H1}$  IgG4] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [ $C_{H2}$  IgG4] - [ $C_{H3}$  IgG4]. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [ $C_{H1}$  IgG1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [ $C_{H2}$  IgG4] - [ $C_{H3}$  IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, описаны в публикации патента США № 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 года, которая включена в данный документ в полном объеме. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные перестановки, и их варианты могут иметь измененное связывание рецептора Fc, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

#### **Варианты последовательностей**

**[0100]** Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, вставок и/или делеций в

каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко определены путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получают из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, в которых одна или большее количество аминокислот в пределах одной или большего количества каркасных и/или CDR областей мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все каркасные и/или CDR-остатки в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления, только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или большее количество каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально был получен антигенсвязывающий домен). Дополнительно, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию из двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или большее количество мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или большее

количество желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические, или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность и др. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или большее количество антигенсвязывающих доменов, полученных этим общепринятым способом, охватываются данным изобретением.

#### **рН-зависимое связывание**

**[0101]** Данное изобретение включает в себя анти-ВСМА антитела, и анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, анти-ВСМА антитело согласно данному изобретению может проявлять пониженное связывание с ВСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. В альтернативном варианте, анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению могут проявлять повышенное связывание с ВСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение «кислый рН» включает в себя значения рН меньше чем около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. В контексте данного документа, выражение «нейтральный рН» означает рН от около 7,0 до около 7,4. Выражение «нейтральный рН» включает в себя значения рН около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

**[0102]** В некоторых случаях, «уменьшенное связывание ... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» выражается в виде 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 проявляющее(щий) «сниженное связывание с ВСМА при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» для целей данного изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует соотношение кислой/нейтральной  $K_d$  около 3,0 или больше. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, соотношение кислой/нейтральной  $K_d$  для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно данному изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или выше.

**[0103]** Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на предмет сниженного (или усиленного) связывания с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Дополнительно, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или большего количества аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в пределах CDR) на остаток гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом рН относительно

нейтрального рН.

#### **Антитела, содержащие варианты Fc**

**[0104]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, предлагаются анти-BCMA антитела, и анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН. Например, данное изобретение включает в себя антитела, содержащие мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 домена Fc, при этом мутация(ии) увеличивает(ют) аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, при этом рН находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в позиции 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T), и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F), и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает в себя 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).

**[0105]** Например, данное изобретение включает в себя анти-BCMA антитела, и анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие домен Fc, содержащий одну или большее количество 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 домена Fc и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрытых в данном документе, рассматриваются как находящиеся в объеме данного изобретения.

#### **Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул**

**[0106]** Данное изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают BCMA человека с высокой аффинностью (например, с наномолярными или суб-наномолярными значениями K<sub>d</sub>).

**[0107]** Согласно некоторым вариантам осуществления, данное изобретение включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают BCMA человека (например, при 25 °C), с K<sub>d</sub> меньше чем около 5 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата

анализа, как определено в Примере 4 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению связывают ВСМА с  $K_d$  меньше чем около 20 нМ, меньше чем около 10 нМ, меньше чем около 8 нМ, меньше чем около 7 нМ, меньше чем около 6 нМ, меньше чем около 5 нМ, меньше чем около 4 нМ, меньше чем около 3 нМ, меньше чем около 2 нМ, меньше чем около 1 нМ, меньше чем около 800 пМ, меньше чем около 700 пМ, меньше чем около 500 пМ, меньше чем около 400 пМ, меньше чем около 300 пМ, меньше чем около 200 пМ, меньше чем около 100 пМ, меньше чем около 50 пМ или меньше чем около 25 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа как определено в Примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. Данное изобретение включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые связывают ВСМА человека с  $K_d$  меньше чем около 25 пМ, и которые связывают ВСМА обезьяны с  $K_d$  меньше чем около 170 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа.

**[0108]** Данное изобретение также включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ВСМА с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ), большим чем около 10 минут или большим чем около 125 минуты, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 °С, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению связывают ВСМА с  $t_{1/2}$ , большим чем около 3 минут, большим чем около 4 минут, большим чем около 10 минут, большим чем около 20 минут, большим чем около 30 минут, большим чем около 40 минут, большим чем около 50 минут, большим чем около 60 минут, большим чем около 70 минут, большим чем около 80 минут, большим чем около 90 минут, большим чем около 100 минут, большим чем около 110 минут или большим чем около 120 минут, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 °С, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. Данное изобретение включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые связывают ВСМА с  $t_{1/2}$  больше чем около 10 минут, как измеренно с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 °С, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа.

**[0109]** Данное изобретение также включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с линиями клеток человека, экспрессирующими эндогенный ВСМА (например, NCI-H929, MOLP-8 или OMP-2), как определено с помощью анализа связывания FACS, как изложено в Пример 6,

или по существу аналогичного анализа.

**[0110]** Данное изобретение также включает в себя анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют одну или большее количество характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (а) ингибирования роста опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы человека; (b) ингибирования опухолевого роста развившихся опухолей у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы человека (см., например, Примеры 10-15), и (с) подавления опухолевого роста сингенной меланомы и клеток карциномы толстой кишки, сконструированных для экспрессии BCMA человека у иммунокомпетентных мышей, экспрессирующих CD3 человека.

**[0111]** Данное изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека с высокой аффинностью. Данное изобретение также включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных желательных свойств нацеливания. В некоторых случаях, низкая аффинность включает в себя антитела, которые связывают CD3 с  $K_d$  или  $EC_{50}$  (например, в анализе поверхностного плазмонного резонанса) больше чем 300 нМ, больше чем 500 нМ или больше чем 1 мкМ. Данное изобретение также включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека без поддающейся измерению аффинности. Например, в контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD3, а другое плечо связывает целевой антиген (например, BCMA), может быть желательно для целевого антигенсвязывающего плеча связывать целевой антиген с высокой аффинностью, в то время как плечо анти-CD3 связывает CD3 только с средней или низкой аффинностью, или аффинность отсутствует. Таким образом, может быть достигнуто предпочтительное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие целевой антиген, при одновременном предотвращении общего/нецелевого связывания CD3 и связанных с этим побочных эффектов.

**[0112]** Данное изобретение включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с CD3 человека и BCMA человека. Связывающее плечо, которое взаимодействует с клетками, экспрессирующими CD3, может иметь слабое или не определяемое связывание, как измерено в подходящем анализе связывания *in vitro*. Степень, в которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD3 и/или BCMA, можно оценить с помощью сортировки флуоресцентно-активируемых клеток (FACS), как показано в Примерах 5 и 6 в данном документе.

**[0113]** Например, данное изобретение включает в себя антитела,

антигенсвязывающие фрагменты и вышеупомянутые биспецифические антитела, которые специфически связываются с линиями Т-лимфоцитов человека, которые экспрессируют CD3, но не экспрессируют ВСМА (например, Jurkat) и/или клетками, экспрессирующими ВСМА.

**[0114]** Данное изобретение включает в себя антитела, антигенсвязывающие фрагменты и вышеупомянутые биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека со слабой (т.е. низкой) аффинностью или аффинностью, которую невозможно измерить.

**[0115]** Данное изобретение включает в себя антитела, антигенсвязывающие фрагменты и вышеупомянутые биспецифические антитела, которые связывают CD3 обезьяны (т.е. яванского макака) со слабой (т.е. низкой) аффинностью или аффинностью, которую невозможно измерить.

**[0116]** Данное изобретение включает в себя антитела, антигенсвязывающие фрагменты и вышеупомянутые биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека и индуцируют активацию Т-лимфоцитов.

**[0117]** Данное изобретение включает в себя анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые способны истощать или уменьшать количество опухолевых антиген-экспрессирующих клеток у субъекта (см., например, Примеры 8-16 или по существу аналогичный анализ). Например, согласно некоторым вариантам осуществления, предлагаются анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, при этом однократное или многократное введение 0,04 мг/кг, 0,4 мг/кг или 4 мг/кг биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту вызывает уменьшение количества клеток, экспрессирующих ВСМА, у субъекта (например, рост опухоли у субъекта подавляется или ингибируется).

#### **Эпитопное картирование и родственные методы**

**[0118]** Эпитоп на CD3 и/или ВСМА, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот белка CD3 или ВСМА. В альтернативном варианте, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или ВСМА. Антитела согласно данному изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или больше разных цепях CD3. Термин «эпитоп», в контексте данного документа, относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь больше чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть

конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах, эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

**[0119]** Различные методы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения того, взаимодействует ли антитело с одной или большим количеством аминокислот в полипептиде или белке. Примеры методов включают в себя, например, рутинный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ аланинового сканирования, пептидные блотт-анализы (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), и анализ пептидного расщепления. Дополнительно, могут быть использованы такие способы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является обмен водород/дейтерий, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ обмена водород/дейтерий включает в себя мечение дейтерием белка интереса с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить обмену водород-дейтерий происходить 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 меченные 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. Рентгеновская кристаллография комплекса антиген/антитело также может использоваться для картирования эпитопа.

**[0120]** Данное изобретение дополнительно включает в себя анти-ВСМА антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из специфических иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, представленных в Таблице 1 в данном документе). Аналогичным образом, данное изобретение также включает в себя анти-ВСМА антитела, которые конкурируют за связывание с ВСМА с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, представленных в Таблице 1 в данном документе).

**[0121]** Данное изобретение также включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие второй антигенсвязывающий домен,

который специфически связывает CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низкой или не детектируемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ВСМА человека, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, что и любой из указанных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или при этом второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на ВСМА, что и любой из указанных иллюстративных ВСМА-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

**[0122]** Аналогичным образом, данное изобретение также включает в себя биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ВСМА человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, при этом первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с ВСМА с любым из указанных иллюстративных ВСМА-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или при этом второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из указанных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

**[0123]** Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с ним, что и эталонная антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению, используя стандартные способы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом на ВСМА (или CD3), что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению, эталонной биспецифической молекуле сначала позволяют связываться с белком ВСМА (или белком CD3). Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой ВСМА (или CD3). Если исследуемое антитело способно связываться с ВСМА (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом ВСМА (или CD3), отличным от такового эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой ВСМА (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом ВСМА (или CD3) с которым связывается биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению. Затем может быть проведен дополнительный стандартный эксперимент (например, анализы пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, связано ли фактически наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела со связыванием с тем же самым эпитопом, что и для эталонного антитела, или за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты

такого типа могут быть выполнены с помощью ИФА, РИА (радиоиммунологического анализа), Вiasore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного 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%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В альтернативном варианте, два антигенсвязывающих белка считают связывающимися 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. Считается, 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.

**[0124]** Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонной антигенсвязывающей молекуле позволяют связываться с белком ВСМА (или белком CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой ВСМА (или CD3). Во второй ориентации исследуемому антителу позволяют связываться с молекулой ВСМА (или CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой ВСМА (или CD3). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой ВСМА (или CD3), то делается вывод, что исследуемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с ВСМА (или CD3). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

#### **Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул**

**[0125]** Антигенсвязывающие домены, специфичные к конкретным антигенам, можно получить с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения двух разных антигенсвязывающих доменов, специфичных к двум разным антигенам (например, CD3 и ВСМА), их можно соответствующим образом расположить относительно друг друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению с

использованием обычных способов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифических антител, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, приведено в другом месте в данном документе). В некоторых вариантах осуществления, один или большее количество отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одна или большее количество тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител) первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к конкретному антигену (например, CD3 или ВСМА), имеющему переменную область человека и константную область мыши. Антитела охарактеризованы и отобраны по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Константные области мыши заменяют желательной константной областью человека для генерирования полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению.

**[0126]** Геннетически сконструированные животные могут быть использованы для создания биспецифических антигенсвязывающих молекул человека. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна перестраивать и экспрессировать эндогенную последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина мыши, при этом мышь экспрессирует только один или два переменных домена легкой цепи человека, кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном константной области каппа мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит переменный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена переменной области легкой цепи человека. (См., например, US 2011/0195454). Полностью человеческое относится к антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, или его иммуноглобулиновому домену, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из последовательности человека, по всей длине каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его иммуноглобулинового домена. В некоторых случаях, полностью человеческую последовательность получают из белка, эндогенного для человека. В других случаях, полностью человеческий белок или последовательность белка содержит химерную последовательность, причем каждую последовательность компонентов получают из человеческой последовательности. Не будучи связанными

какой-либо одной теорией, химерные белки или химерные последовательности в целом конструируют так, чтобы минимизировать создание иммуногенных эпитопов в соединениях последовательностей компонентов, например, по сравнению с любыми областями или доменами человеческого иммуноглобулина дикого типа.

#### **Биоэквиваленты**

**[0127]** Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых иллюстративных молекул, описанных в данном документе, но которые сохраняют способность связывать CD3 и/или ВСМА. Такие варианты антитела могут содержать одну или большее количество добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна таковой описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

**[0128]** Данное изобретение включает в себя антигенсвязывающие молекулы, которые биоэквивалентны любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, например, если они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень всасывания которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в однократной дозе, так и многократных дозах. Некоторые антигенсвязывающие белки 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 отражаются в маркировке, то это не имеет существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственных средств в организме, например, при постоянном применении, и считается с медицинской точки зрения незначительным для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

**[0129]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

**[0130]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переключать один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

**[0131]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или условий применения в той степени, в которой такие механизмы известны.

**[0132]** Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают в себя, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) тест *in vitro*, который был скоррелирован с данными о биологической доступности у человека *in vivo* и достаточно обоснованно предсказывал их; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

**[0133]** Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в данном документе, могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей, или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить формирование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать в себя варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержащих изменения аминокислот, которые изменяют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

#### **Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами**

**[0134]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предлагаются антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека, но не с CD3 других видов. Также предлагаются антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ВСМА человека, но не с ВСМА других видов. Данное изобретение также включает в себя антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и с CD3 одного или большего количества видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ВСМА человека и с ВСМА одного или большего количества видов, отличных от человека.

**[0135]** Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления изобретения, предлагаются антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 человека и/или ВСМА человека, и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или большим количеством CD3 и/или ВСМА: мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макаки-резус или шимпанзе. Например, в конкретных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения

предлагаются биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА человека и ВСМА яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, или биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА человека и ВСМА яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека.

#### **Терапевтический препарат и введение**

**[0136]** Данное изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению готовят с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих препаратов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти препараты включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло в воде» или «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.

**[0137]** Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, патологий, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно данному изобретению используют для терапевтических целей у взрослого пациента, может быть полезным внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению, как правило, в разовой дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5, или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести патологии, частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены опытным путем; например, прогресс субъекта может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области техники способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

**[0138]** Известны различные системы доставки, и их можно использовать для

введения фармацевтической композиции согласно данному изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. Композиция может быть введена с помощью любого удобного пути, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкого кишечника и т.п.), а также может быть введена совместно с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

**[0139]** Фармацевтическую композицию согласно данному изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприце-ручке для доставки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция внутри картриджа была введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Шприц-ручка для доставки затем может быть повторно использован. В одноразовой шприце-ручке для доставки нет сменного картриджа. Предпочтительно одноразовый шприц-ручка приходит заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри изделия. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

**[0140]** Многочисленные многоразовые шприцы-ручки и автоинжекторные устройства доставки находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Примеры включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка 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-ручка BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия) и другие. Примеры одноразовых шприцев-ручек для доставки, имеющих применение для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно данному изобретению, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: шприц-ручка SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly),

автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Саузенд Оакс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и шприц-ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот парк, Иллиной), если назвать только несколько.

**[0141]** В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления, может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом 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 цели композиции, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

**[0142]** Инъекционные препараты могут включать в себя дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.п. Эти инъекционные препараты могут быть получены с помощью общеизвестных способов. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т. д., которые могут использоваться в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Приготовленная таким образом инъекция предпочтительно заполняется в соответствующую ампулу.

**[0143]** Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в стандартной дозе, подходящей для дозы активного ингредиента. Такие дозированные формы в однократной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. п. Количество содержащегося вышеупомянутого антигена, как правило, составляет от около 5 до около 500 мг на дозированную форму в однократной дозе; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антигеном содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других дозированных форм.

### **Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул**

**[0144]** Данное изобретение включает в себя способы, включающие в себя введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей анти-BCMA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает CD3 и BCMA. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В контексте данного документа, выражение «нуждающийся в этом субъект» обозначает человека или животное, отличное от человека, которое проявляет один или большее количество симптомов или признаков рака (например, субъект с опухолью или страдающий от любого из видов рака, упомянутых в данном документе ниже), или который иным образом получает пользу от ингибирования или снижения активности BCMA или истощения BCMA<sup>+</sup> клеток (например, клеток множественной миеломы).

**[0145]** Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению (и терапевтические композиции, содержащие их) являются полезными, *inter alia*, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа могут быть полезными. В частности, анти-BCMA антитела или анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению можно использовать для лечения, предотвращения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного с или опосредованного экспрессией BCMA, или активностью или пролиферацией клеток BCMA<sup>+</sup>. Механизм действия, посредством которого достигаются терапевтические способы согласно данному изобретению, включает в себя уничтожение клеток, экспрессирующих BCMA, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством КЗЦ, апоптоза, АЗКЦ, фагоцитоза, или комбинации двух или большего количества из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие BCMA, которые можно ингибировать или уничтожать с помощью использования биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, включают в себя, например, клетки множественной миеломы.

**[0146]** Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению можно использовать для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией BCMA, включая, например, рак, включающий в себя множественную миелому или другие виды рака из В-лимфоцитов или плазматических клеток, например, макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Беркитта и диффузную крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, неходжкинскую лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток зоны мантии, лимфому маргинальной зоны, лимфоплазмоцитарную лимфому и лимфому Ходжкина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, анти-BCMA антитела или анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела полезны для лечения пациента, страдающего от

множественной миеломы. В соответствии с другими родственными вариантами осуществления данного изобретения, предложены способы, включающие в себя введение анти-BCMA антитела или анти-BCMA x анти-CD3 биспецифической молекулы, как раскрыто в данном документе, пациенту, страдающему множественной миеломой. Могут использоваться аналитические/диагностические способы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухолей и т. д., чтобы установить, является ли пациент носителем множественной миеломы или другого рака В-лимфоцитарного происхождения.

**[0147]** Данное изобретение также включает в себя способы лечения остаточного рака у субъекта. В контексте данного документа, термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной, или большего количества раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией.

**[0148]** Согласно определенным аспектам, данное изобретение предлагает способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией BCMA (например, множественной миеломы), включающие в себя введение субъекту одной или большего количества анти-BCMA или биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте в данном документе, после установления наличия у субъекта множественной миеломы. Например, данное изобретение включает в себя способы лечения множественной миеломы, включающие в себя введение пациенту анти-BCMA антитела или анти-BCMA x анти-CD3 биспецифической антигенсвязывающей молекулы 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделя, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или больше после того, как субъект получил другую иммунотерапию или химиотерапию.

#### **Комбинированные терапии и препараты**

**[0149]** Данное изобретение предлагает способы, которые включают в себя введение фармацевтической композиции, содержащей любые из иллюстративных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты, которые могут комбинировать с или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно данному изобретению включают в себя противоопухолевый агент (например, химиотерапевтические агенты, включающие в себя мелфалан, винкристин (Oncovin), циклофосфамид (Cytoxan), этопозид (VP-16), доксорубин (Adriamycin), липосомальный доксорубин (Doxil), обендамустин (Treanda), или любые другие препараты, которые, как известно, эффективны при лечении опухолей из плазматических клеток у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит стероиды. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит целевые терапевтические средства, включая талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые являются препаратами, одобренными для лечения вновь диагностированных пациентов. Леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиностат, иксазомиб, элотузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического агента,

эффективного для лечения рецидивирующей миеломы. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент представляет собой схему, включающую в себя лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор протеасом, включая бортезомиб (Velcade), карфилзомиб (Cuprolis), иксазомиб (Ninlaro). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Farydak). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки, или их комбинации. Другие агенты, которые можно с пользой вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно данному изобретению, включают в себя ингибиторы цитокинов, включая в себя ингибиторы цитокинов-малых молекул и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ- 4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18, или к их соответствующим рецепторам. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, как раскрыто в данном документе) также можно вводить как часть терапевтической схемы, включающей в себя одну или большее количество терапевтических комбинаций, выбранных из: моноклонального антитела, отличного от описанных в данном документе, которое может взаимодействовать с другим антигеном на поверхности плазматических клеток, биспецифического антитела, которое имеет одно плечо, которое связывается с антигеном на поверхности опухолевых клеток, и другое плечо, которое связывается с антигеном на Т-лимфоците, конъюгата антитело-лекарственное средство, биспецифического антитела, конъюгированного с противоопухолевым агентом, ингибитора контрольной точки, например, того, который нацелен на PD-1 или CTLA-4, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda), ниволумаб (Opdivo) или цемиплимаб (REGN2810). В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio) или дурвалумаб (Imfinzi)). В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов CTLA-4, таких как ипилимумаб (Yervoy). Другие комбинации, которые можно использовать вместе с антителом согласно данному изобретению, описаны выше.

**[0150]** Данное изобретение также включает в себя терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или большего количества из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3,

ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, 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, мини-тела и минимальные блоки распознавания). Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению также можно вводить и/или готовить в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВП. Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает в себя лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

**[0151]** Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно до, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению; (для целей данного раскрытия изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

**[0152]** Данное изобретение включает в себя фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающую молекулу согласно данному изобретению совместно готовят с одним или большим количеством дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в другом месте в данном документе.

#### **Схемы введения**

**[0153]** Согласно определенным вариантам осуществления данного изобретения, множество доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-BCMA антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает BCMA и CD3) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени курса лечения. Способы согласно этому аспекту данного изобретения включают в себя последовательное введение субъекту множества доз антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению. В контексте данного документа, «последовательное введение» подразумевает то, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное изобретение включает в себя способы, которые включают в себя последовательное введение пациенту одной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующими одной или большим количеством вторичных доз антигенсвязывающей молекулы, и, необязательно, с последующими одной или большим количеством третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

**[0154]** Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой

дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая «базовой 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 касаясь частоты введения. В некоторых вариантах осуществления, однако, количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, корректируется в большую сторону или меньшую по мере необходимости) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления, две или большее количество (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводятся реже (например, «поддерживающие дозы»).

**[0155]** В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через от 1 до 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 больше) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», в контексте данного документа, означает, в последовательности множества введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

**[0156]** Способы согласно этому аспекту данного изобретения могут включать в себя введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-ВСМА антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает ВСМА и CD3). Например, в определенных вариантах осуществления, пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления, пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) третичных доз.

**[0157]** В вариантах осуществления, включающих в себя множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих в себя множественные третичные дозы, 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 альтернативном варианте, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся субъекту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может

также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

#### **Диагностические применения антител**

**[0158]** Анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения ВСМА, ВСМА-экспрессирующих клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, анти-ВСМА антитело или его фрагмент можно использовать для диагностики патологии или заболевания, характеризующегося аберрантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.) ВСМА. Иллюстративные диагностические анализы для ВСМА могут включать в себя, например, приведение в контакт образца, полученного из пациента, с анти-ВСМА антителом согласно данному изобретению, при этом анти-ВСМА антитело метят детектируемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте, немеченое анти-ВСМА антитело можно использовать в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено пригодным для детекции образом. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другой пример диагностического применения анти-ВСМА антител согласно данному изобретению включает в себя антитело, меченное  $^{89}\text{Zr}$ , например, меченное  $^{89}\text{Zr}$ -дезферриоксамином, с целью неинвазивной идентификации и отслеживания опухолевых клеток у субъекта (например, визуализация позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ)). (См., например, Tavaré, R. et al. *Cancer Res.* 2016 Jan 1;76(1):73-82; и Azad, B. et al. *Oncotarget.* 2016 Mar 15;7(11):12344-58.) Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения ВСМА в образце, включают в себя иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активируемых клеток (FACS).

**[0159]** Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах ВСМА в соответствии с данным изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, получаемый из субъекта, который содержит пригодные для детекции количества белка ВСМА, или его фрагментов, в нормальных или патологических условиях. В целом, уровни ВСМА в конкретном образце, полученном из здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или патологией, связанными с аномальными уровнями или активностью ВСМА), будут измерять для первоначальной установки исходного или стандартного уровня ВСМА. Затем этот исходный уровень ВСМА можно сравнить с уровнями ВСМА, измеренными в образцах, полученных от лиц, подозреваемых в наличии связанного с ВСМА заболевания (например, опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие ВСМА), или патологии.

#### **ПРИМЕРЫ**

**[0160]** Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как разрабатывать и применять способы и композиции согласно данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

**Пример 1: Генерация анти-ВСМА антител**

**[0161]** Анти-ВСМА антитела были получены путем иммунизации генетически модифицированной мыши антигеном ВСМА человека (например, hBCMA, SEQ ID NO: 115) или путем иммунизации сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека, антигеном ВСМА человека.

**[0162]** После иммунизации спленциты собирали у каждой мыши и либо (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования клеток гибридомы, и проверяли на специфичность ВСМА, либо (2) отсортировывали В-лимфоциты (как описано в US 2007/0280945A1), путем использования фрагмента ВСМА человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-лимфоциты).

**[0163]** Первоначально были выделены химерные антитела к ВСМА, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. При необходимости константные области мыши были заменены желаемой константной областью человека, например, константной областью дикого типа или модифицированной областью IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого анти-ВСМА антитела. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, свойства высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности находятся в переменной области.

**[0164]** *Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей анти-ВСМА антител:* В Таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных анти-ВСМА антител согласно данному изобретению. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 2.

**Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей**

	SEQ ID NO:
--	------------

Обозначение антитела	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb21587	122				123			
mAb21589	124				125			

**Таблица 2: Идентификаторы нуклеотидных последовательностей**

SEQ ID NO:								
Обозначение антитела	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

**Пример 2: Генерация анти-CD3 антител**

[0165] Анти-CD3 антитела были получены, как описано в WO 2017/053856, который включен в данный документ посредством ссылки. Два таких анти-CD3 антитела были выбраны из продукции анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител в соответствии с данным изобретением. В Таблице 3 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных анти-CD3 антител. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 4. Другие анти-CD3 антитела для использования при получении биспецифических антител в соответствии с данным изобретением можно найти, например, в WO 2014/047231.

**Таблица 3: Идентификаторы аминокислотных последовательностей**

SEQ ID NO:								
Обозначение антитела	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb7221G	90	92	94	96	82	84	86	88
mAb7221G20	98	100	102	104	82	84	86	88

**Таблица 4: Идентификаторы нуклеотидных последовательностей**

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb7221G	89	91	93	95	81	83	85	87
mAb7221G20	97	99	101	103	81	83	85	87

### Пример 3: Генерация биспецифических антител, связывающих ВСМА и CD3

**[0166]** Данное изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD3 и ВСМА; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также упоминаются в данном документе как «анти-ВСМА x анти-CD3 или анти-CD3xВСМА или анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифические молекулы». Анти-ВСМА часть анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифической молекулы полезна для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют ВСМА (также известный как CD269), а анти-CD3 часть биспецифической молекулы полезна для активации Т-лимфоцитов. Одновременное связывание ВСМА с опухолевой клеткой и CD3 на Т-лимфоците способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) целевой опухолевой клетки с помощью активированного Т-лимфоцита.

**[0167]** Биспецифические антитела, содержащие анти-ВСМА-специфический связывающий домен и анти-CD3-специфический связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методов, причем каждый из анти-ВСМА антигенсвязывающего домена и анти-CD3 антигенсвязывающего домена содержит разные, отдельные HCVR в паре с общим LCVR. В иллюстративных биспецифических антителах молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-ВСМА антитела и общей легкой цепи из анти-CD3 антитела (10082). В других случаях, биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-ВСМА антитела и легкой цепи антитела, о которой известно, что она беспорядочно или эффективно формируют пары с различными плечами тяжелой цепи.

**Таблица 5: Обзор составных частей анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител**

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-ВСМА	Анти-CD3	Общая варибельная область легкой цепи
	Антиген- связывающий домен	Антиген- связывающий домен	
	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	

bsAb25441D9 (также упоминается как REGN5458)	mAb21581	mAb7221G	mAb7221G
bsAb25442D (также упоминается как REGN5459)	mAb21581	mAb7221G20	mAb7221G20

**[0168]** В Таблице 6 показаны идентификаторы аминокислотных последовательностей биспецифических анти-BCMA x анти-CD3 антител, приведенных в качестве примеров в данном документе.

**Таблица 6: Аминокислотные последовательности анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител**

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-BCMA Первый антиген-связывающий домен				Анти-CD3 Второй антиген-связывающий домен				Общая варибельная область легкой цепи			
	H	HCD	HC	HC	H	HCD	HCD	HCD	L	LCD	LC	LC
	C	R1	DR2	DR3	C	R1	R2	R3	C	R1	DR2	DR3
bsAb25441D (REGN5458)	66	68	70	72	90	92	94	96	82	84	86	88
bsAb25442D (REGN5459)	66	68	70	72	98	100	102	104	82	84	86	88

**Пример 4: Полученные с помощью поверхностного плазмонного резонанса значения аффинности связывания, и кинетические константы анти-BCMA антител и анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител**

**[0169]** Константы равновесной диссоциации (значения  $K_d$ ) для связывания hBCMA.mmh (SEQ ID NO: 106) с очищенными анти-BCMA mAb и биспецифическими анти-BCMA x анти-CD3 mAb определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием инструмента Biacore 4000. Поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали путем связывания амина с моноклональным мышинным антителом против Fc человека (GE, кат. № BR-1008-39) для захвата очищенных анти-BCMA mAb и анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических mAb. Все исследования связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 M HEPES,

pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. ПАВ P20 (рабочий буфер HBS-ET). Что касается мономерной аффинности, различные концентрации внеклеточного домена ВСМА человека, экспрессированного с помощью С-концевого тэга мус-мус-гексагистидин (человеческий ВСМА-ММН; SEQ ID NO: 106), или ВСМА обезьяны, экспрессированного с помощью С-концевого тэга мус-мус-гексагистидин (обезьяний ВСМА-ММН; SEQ ID NO: 110) готовили в рабочем буфере HBS-ET (в диапазоне от 90 до 1,11 нМ, 3-кратные разведения). Что касается димерной аффинности, различные концентрации внеклеточного домена ВСМА человека, экспрессированного с помощью С-концевого тэга mFc (человеческий ВСМА-MFC; SEQ ID NO: 108), ВСМА обезьяны, экспрессированного с помощью С-концевого тэга mFc (обезьяний ВСМА-MFC; SEQ ID NO: 112), готовили в рабочем буфере HBS-ET (в диапазоне от 30 до 0,37 нМ, 3-кратные разведения), или 30 нМ ВСМА, экспрессированного с С-концевым тэгом mFc (мышинный ВСМА-MFC; SEQ ID NO: 114). Затем образцы антигена вводили на поверхности с захваченными анти-ВСМА и анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифическим mAb со скоростью потока 30 мкл/мин. За ассоциацией антитело-реагент наблюдали в течение 5 минут, тогда как за диссоциацией в рабочем буфере HBS-ET наблюдали в течение 10 минут. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25 °С. Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подгонки сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подгонки кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и периоды полужизни для диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[0170] Как показано в Таблице 7, при 25°C все анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению связывались с человеческим ВСМА-ММН со значениями  $K_D$  в диапазоне от 1,06 нМ до 3,56 нМ. Как показано в Таблице 8, при 25°C все анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению связывались с человеческим ВСМА-MFC со значениями  $K_D$  в диапазоне от 22,3 пМ до 103 пМ. Как показано в Таблице 9, при 25°C все анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению связывались с обезьяним ВСМА-ММН со значениями  $K_D$  в диапазоне от 38,8 нМ до 49,92 нМ. Как показано в Таблице 10, при 25°C все анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению связывались с обезьяним ВСМА-MFC со значениями  $K_D$  в диапазоне от 148 пМ до 14,7 пМ. Как показано в Таблице 11, при 25°C все анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению связывались с мышинным ВСМА-MFC со значениями  $K_D$  в диапазоне от 677 пМ до 18,8 пМ.

**Таблица 7: Параметры кинетики связывания анти-ВСМА моноклональных антител при связывании с человеческим ВСМА-ММН при 25 °С**

REGN №	Ab PID №	Захват mAb (OE)	Связывание 90 нМ	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$ (мин)
--------	----------	-----------------	------------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

			<b>hBCMA.m mh (OE)</b>				)
REGN5 458	bsAb2544 1D	437,5 ± 1,1	19,9	8,27E+05	8,74E- 04	1,06E- 09	13,2
REGN5 459	bsAb2544 2D	384,8 ± 1,4	17,0	7,30E+05	1,01E- 03	1,38E- 09	11,5
	mAb16711	275,0 ± 2,8	22,2	2,01E+06	3,47E- 03	1,73E- 09	3,3
	mAb16716	310,3 ± 2,2	26,4	8,41E+05	2,99E- 03	3,56E- 09	3,9
REGN4 514	mAb16732	284,1 ± 0,9	25,3	1,06E+06	2,85E- 03	2,69E- 09	4,1
REGN4 515	mAb16747	332,5 ± 0,9	31,4	8,69E+05	2,47E- 03	2,84E- 09	4,7

**Таблица 8: Параметры кинетики связывания анти-BCMA моноклональных антител при связывании с человеческим BCMA-MFC при 25 °C**

<b>REGN №</b>	<b>Ab PID №</b>	<b>Захват mAb (OE)</b>	<b>Связыван ие 30 нм hBCMA.m Fc (OE)</b>	<b>ka (1/Mc)</b>	<b>kd (1/c)</b>	<b>K<sub>D</sub> (M)</b>	<b>t1/2 (мин)</b>
REGN545 8	bsAb25441 D	437,9 ± 0,1	106,8	4,48E+0 5	≤ 1E-5	2,23E- 11	≤1155
REGN545 9	bsAb25442 D	385,2 ± 0,1	96,8	4,49E+0 5	≤ 1E-5	2,23E- 11	≤1155
	mAb16711	268,9 ± 1,4	113,5	1,85E+0 6	1,90E- 04	1,03E- 10	60,8
	mAb16716	303,4 ± 1,2	120,3	8,62E+0 5	8,35E- 05	9,68E- 11	138,4
REGN451 4	mAb16732	282,3 ± 1,0	124,1	1,07E+0 6	4,53E- 05	4,22E- 11	255,2
REGN451 5	mAb16747	327,3 ± 1,5	146,0	1,41E+0 6	8,95E- 05	6,33E- 11	129,0

**Таблица 9: Параметры кинетики связывания анти-BCMA моноклональных антител при связывании с обезьяним BCMA-MMH при 25 °C**

REGN №	Ab PID №	Захват mAb (OE)	Связывание 90 нМ mfBCMA.m mh (OE)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	К <sub>д</sub> (М)	t1/2 (мин)
REGN545 8	bsAb25441 D	438,2 ± 0,9	14,8	1,82E+0 5	9,09E- 03	4,99E-08	1,3
REGN545 9	bsAb25442 D	384,6 ± 1,4	12,7	2,23E+0 5	8,64E- 03	3,88E-08	1,3
	mAb16711	263,5 ± 1,7	-0,5	HC	HC	HC	HC
	mAb16716	301,8 ± 0,5	0,8	HC	HC	HC	HC
REGN451 4	mAb16732	279,1 ± 0,8	1,1	HC	HC	HC	HC
REGN451 5	mAb16747	326,2 ± 0,5	1,9	HC	HC	HC	HC

**Таблица 10: Параметры кинетики связывания анти-BCMA моноклональных антител при связывании с обезьяним BCMA-MFC при 25 °С**

REGN №	Ab PID №	Захват mAb (OE)	Связывани е 30 нМ mfBCMA.m Fc (OE)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	К <sub>д</sub> (М)	t1/2 (мин)
REGN545 8	bsAb25441 D	437,9 ± 1,1	107,7	5,28E+0 5	8,80E- 05	1,67E- 10	131,2
REGN545 9	bsAb25442 D	386,2 ± 0,22	97,0	4,82E+0 5	7,15E- 05	1,48E- 10	161,6
	mAb16711	259,4 ± 1,4	0,9	HC	HC	HC	HC
	mAb16716	300,8 ± 0,6	3,2	IC	IC	IC	IC
REGN451 4	mAb16732	276,9 ± 1,1	40,3	4,92E+0 5	7,24E- 03	1,47E- 08	1,6
REGN451 5	mAb16747	324,4 ± 0,7	101,3	2,13E+0 6	7,16E- 03	3,37E- 09	1,6

**Таблица 11: Параметры кинетики связывания анти-BCMA моноклональных**

**антител при связывании с мышинным ВСМА-МFC при 25 °С**

REGN №	Ab PID №	Захват mAb (OE)	Связывани е 30 нМ mBCMA.m Fc (OE)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K <sub>d</sub> (M)	t1/2 (мин )
REGN545 8	bsAb25441 D	438,8	2,7	HC	HC	HC	HC
REGN545 9	bsAb25442 D	383,9	2,4	HC	HC	HC	HC
	mAb16711	257,0	90,0	1,07E+0 6	1,10E- 03	1,02E- 09	10,5
	mAb16716	300,0	33,4	2,05E+0 5	3,85E- 03	1,88E- 08	3,0
REGN451 4	mAb16732	276,1	109,6	3,97E+0 5	2,69E- 04	6,77E- 10	43,0
REGN451 5	mAb16747	323,1	107,6	9,47E+0 5	4,18E- 03	4,42E- 09	2,8

**Пример 5: Связывание по FACS анти-ВСМА х анти-CD3 биспецифических антител с клетками, экспрессирующими CD3 человека и яванского макака**

[0171] Анализ проточной цитометрии использовали для определения связывания ВСМАхCD3 биспецифических антител с CD3 человека и яванского макака (клетки Jurkat, сконструированные mfCD3 клетки Jurkat, первичные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты человека и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты яванского макака). Вкратце, 1e05 клеток/лунка инкубировали в присутствии раствора для промывки FACS с блокирующим раствором (ФСБ+1% отфильтрованный ФБС+5% сыворотка мыши) с серийным разведением ВСМАхCD3 и контрольными антителами в течение 30 минут на льду. После инкубации клетки дважды промывали холодным раствором для промывки FACS (ФСБ+ 1% отфильтрованный ФБС), и связанное антитело выявляли путем инкубирования с конъюгированным с Alexa647 вторичным анти-человеческим антителом на льду в течение дополнительных 30 минут. Использовали в качестве контроля лунки, не содержащие антитела или содержащие только вторичные антитела. Для обнаружения Т-лимфоцитов обезьяны и человека к вторичным анти-человеческим антителам добавляли смесь перекрестно-реактивных антител человека и яванского макака к CD4, CD8 и CD16. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% отфильтрованную ФБС, и анализировали с помощью проточной цитометрии на BD FACS Canto II. Клетки гейтировали (gated) с помощью FSC-H, с помощью FSC-A, чтобы выбрать одиночные клетки, с последующим боковым и прямым светорассеянием для выбора

живых клеток. Для Т-лимфоцитов обезьян было выполнено дополнительное гейтирование по клеткам CD8+/CD16-.

**[0172]** Значения EC50 для связывания FACS рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении Prism.

**[0173]** Клетки Jurkat представляют собой линию лимфобластных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих CD3. REGN5458 связывалось с CD3 человека на клетках Jurkat и первичными CD8+ Т-лимфоцитами человека с медианными значениями EC50  $1,50 \times 10^{-8}$  М и  $3,20 \times 10^{-8}$  М, соответственно. Связывание REGN5459 с CD3 человека было более слабым, с медианным значением EC50  $5,58 \times 10^{-7}$  М для клеток Jurkat и  $4,71 \times 10^{-6}$  для первичных CD8+ Т-лимфоцитов человека. С использованием технологии CRISPR/Cas9 была сконструирована клеточная линия Jurkat для экспрессии цепей CD3ε и CD3δ яванского макака вместо человеческих версий. Медиана EC50 связывания REGN5458 с mfCD3-сконструированной клеточной линией Jurkat составляла  $1,51 \times 10^{-8}$  М, и с первичным CD8+ Т-лимфоцитами человека составляла  $4,66 \times 10^{-8}$  М. REGN5459 не связывалось с клетками, экспрессирующими mfCD3.

**[0174]** Ни в одной клеточной линии не наблюдалось связывание антитела отрицательного изотипного контроля, обозначенного mAb15260.

**Таблица 12: Связывание с клетками, экспрессирующими CD3: медиана EC50**

REGN	Jurkat-hCD3		Jurkat-mfCD3		CD8+ Т-лимфоциты человека		Mf (яванск.) CD8+ Т-лимфоциты	
	EC50 [М]	n	EC50 [М]	n	EC50 [М]	n	EC50 [М]	n
REGN5458	1,50E-08	5	1,51E-08	2	3,20E-08	1	4,66E-08	1
REGN5459	5,58E-07	5	Нет связывания	2	4,71E-06	1	Нет связывания	1

**Пример 6: Анализ связывания FACS для оценки способности связывания антигена клеточной поверхности**

**[0175]** Способность анти-BCMA x CD3 антитела, mAb25442D, связываться с поверхностью BCMA-положительной множественной миеломы (NCI-H929, MM.1S, RPM-2 и RPMI-8226), BCMA-положительной лимфомы (Raji и Daudi), и BCMA-отрицательных (HEK293) клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Клетки собирали из колб с использованием буфера для диссоциации клеток (Millipore, кат. № S-004-C) и высевали в буфер для окрашивания (ФСБ, без кальция и магния (Irving 9240) + 2% ФБС (ATCC 30-2020) при плотности 500000 клеток на лунку в 96-луночную планшетку с V-образным дном. Клетки окрашивали 30 мин при 4°C с двукратными серийными разведениями конъюгированного с Alexa647 анти-BCMA x CD3 антитела (mAb25442D-A647) или конъюгированного с Alexa 647 изотипного контроля с тем же самым CD3-связывающим

плечом в паре с нерелевантным плечом нацеливания на опухоль (Isotype-A647). Клетки дважды промывали окрашивающим буфером и метили с помощью набора LIVE/DEAD™ Fixable Green Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, L34970) в соответствии с инструкциями производителя для различения живых и мертвых клеток. Затем клетки промывали и фиксировали в течение 25 минут при 4°C с использованием 50% раствора BD Cytofix (BD, кат. № 554655), разбавленного ФСБ. Образцы были прогнаны на проточном цитометре Accuri C6 (BD Biosciences) и проанализированы в Flowjo 10.2 (Tree Star). После гейтирования для живых клеток и одиночных клеток определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), и значения СИФ наносили на график в Graphpad Prism с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой отклика для расчета EC<sub>50</sub>. Нулевое условие для каждой кривой доза-ответ также включено в анализ как продолжение двукратного серийного разведения и представлено как самая низкая доза. Отношение сигнал/шум (С/Ш) определяют, взяв отношение СИФ mAb25442D-A647 к СИФ Isotype-A647. (Таблица 13). С/Ш mAb25442D-A647 находилось в диапазоне от 2 до 470, а значения EC<sub>50</sub> - от 27 до 83 нМ. На клетках НЕК293 не наблюдали детектируемого связывания.

**Таблица 13: Связывание с клетками**

Клеточная линия	mAb25442D-A647 С/Ш	mAb25442D-A647 EC <sub>50</sub> (нМ)
NCI-H929	470	79
MM.1S	43	83
OPM-2	19	57
RPMI-8226	9	27
Daudi	3	НО
Raji	2	НО
НЕК293	1	НО

НО=не определено из-за несигмоидальных кривых

**Пример 7: Активация Т-лимфоцитов с помощью биспецифических антител анти-BCMA x анти-CD3 в присутствии клеток, экспрессирующих BCMA**

[0176] Активность анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител оценивали в репортерном биоанализе Jurkat/NFATLuc с использованием нескольких клеточных линий с различными уровнями экспрессии BCMA на поверхности. Клетки Jurkat были сконструированы для экспрессии люциферазного репортера NFAT (Jurkat/NFATLuc.3C7), и 50000 репортерных клеток Jurkat объединяли с 50000 BCMA-положительных (Daudi, MM1-S, NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226, MOLP-8 или Raji) или BCMA-отрицательных клеток (НЕК293) в 96-луночных белых микроплашках Thermo Nunclon delta (Thermo Scientific, кат. № 136102) в 50 мкл среды для анализа (среда RPMI с 10% ФБС и 1% P/S/G). Трехкратные серийные разведения BCMA x CD3 биспецифических антител (mAb25441D или mAb25442D) или бивалентного анти-BCMA антитела (mAb21581) немедленно добавляли в 50 мкл буфера для анализа. Плашки осторожно встряхивали и инкубировали

в 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 4-6 часов. Активность NFAT-люциферазы определяли с использованием Promega One-Glo (кат. № E6130) и считывателя плашек Perkin Elmer Envision. ОЕЛ были нанесены на график в GraphPad Prism с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой отклика для расчета значений EC<sub>50</sub>. Также в анализ включали условие отсутствия обработки антителами для каждой кривой доза-ответ в виде продолжения трехкратного серийного разведения, и оно представлено как наименьшая доза. Соотношение сигнал/шум (С:Ш) определяется отношением наибольшего ОЕЛ на кривой к наименьшему.

[0177] mAb25441D активировало клетки Jurkat/NFATLuc в присутствии клеток, экспрессирующих ВСМА, с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,61 нМ до 2,1 нМ и С:Ш в диапазоне от 8 до 123. mAb25442D активировало клетки Jurkat/NFATLuc в присутствии клеток, экспрессирующих ВСМА с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 2,6 нМ до 11 нМ и С:Ш в диапазоне от 7 до 120. ВСМА x CD3 биспецифическое mAb25441D с плечом связывания с CD3 с более высокой аффинностью было постоянно более эффективным, чем mAb25442D с плечом связывания с CD3 с более низкой аффинностью; тогда как С:Ш было сходным для двух биспецифических препаратов. Ни одно из антител не активировало клетки Jurkat/NFATLuc в присутствии клеток НЕК293, а контрольные биспецифические антитела не вызывали значительного увеличения активности репортера Jurkat ни с одной из протестированных клеточных линий. Результаты показаны в Таблицах 14А и 14В ниже.

**Таблица 14А: Активация Т-лимфоцитов**

Антитела	Daudi		MM1-S		NCI-H929		OPM-2	
	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш
bsAb25441D	2,1E-9	43	1,2E-9	165	6,8E-10	39	6,6E-10	8
bsAb25442D	7,9E-9	25	4,4E-9	120	2,7E-9	32	2,6E-9	7
mAb21581	НО	1	НО	1	НО	1	НО	1

**Таблица 14В: Активация Т-лимфоцитов**

Антитела	RPMI-8226		MOLP-8		Raji		НЕК293	
	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш	EC50	С:Ш
bsAb25441D	6,1E-10	55	1,4E-9	32	1,6E-9	123	НО	1
bsAb25442D	2,6E-9	42	1,1E-8	31	7,4E-9	78	НО	1
mAb21581	НО	1	НО	1	НО	1	НО	1

**Пример 8: Анализ цитотоксичности на основе FACS для оценки опосредованного Т-лимфоцитами уничтожения ВСМА-экспрессирующих клеток множественной миеломы в присутствии анти-ВСМА x анти-CD3 биспецифических антител**

[0178] Способность связывания антитела (ABC) коммерчески доступного антитела против ВСМА человека (клон 19F2) определяли на панели клеточных линий

множественной миеломы с использованием набора Quantum Simply Cellular против IgG человека и следуя инструкциям производителя (Bangs Laboratories).

**[0179]** Вкратце, линии клеток множественной миеломы (MM) (H929, MM1S, U266, MOLP8 и RPMI8226) и гранулы Quantum Simply Cellular инкубировали в течение 30 минут при 4°C с титрованием APC конъюгированными анти-hBCMA-19F2 антителами. После инкубации клетки и гранулы промывали три раза, ресуспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% профильтрованный ФБС, и анализировали проточной цитометрией. Используя шаблон QuickCal® (Bangs Labs), ABC уровня насыщения анти-BCMA 19F2 для каждой клеточной линии интерполировали из стандартной кривой, полученной из интенсивности канала группы гранул при насыщении.

**[0180]** Уничтожение целевых клеток, экспрессирующих BCMA, Т-лимфоцитами человека или яванского макака в состоянии покоя определяли проточной цитометрией. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека или яванского макака высевали в дополненную среду RPMI (человек) или X-Vivo (яван. макак) в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения на лимфоциты за счет истощения прилипающих макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день целевые клетки, экспрессирующие BCMA, метили 1 мкМ Violet CellTrace и совместно инкубировали с истощенными прилипшими МКПК (соотношение эффекторные/целевые клетки 4:1) и серийным разведением биспецифических BCMA x CD3 или контрольных антител при 37 °C. Через 48-72 часа клетки извлекали из плашек для культивирования клеток, окрашивали смесью фенотипических антител и красителя для определения живых/мертвых клеток, и анализировали с помощью FACS. Чтобы количественно определить количество живых целевых клеток, присутствующих в лунках, в лунки добавляли 20 мкл гранул CountBright для абсолютного подсчета прямо перед сбором. Для оценки специфичности уничтожения клетки гейтировали с помощью меченных Violet cell tracker популяций. Процент выживаемости целевых клеток рассчитывали следующим образом: Выживание цели =  $(R_1/R_2) \times 100$ , где  $R_1$  = абсолютное количество живых целевых клеток в присутствии эффекторных клеток и антитела, а  $R_2$  = количество только живых целевых клеток (выращенных без эффекторных клеток или исследуемых антител). **[0181]** CD8+ Т-лимфоциты человека гейтировали как CD45+/CD14-/CD4-/CD8+. CD8+ Т-лимфоциты гейтировали как CD45+/CD20-/CD14-/CD4-/CD8+. Об активации Т-лимфоцитов сообщали как процент CD25+ или CD69+ Т-лимфоцитов от общего количества CD8+ Т-лимфоцитов.

**[0182]** Значения EC50 для выживаемости целевых клеток и активации Т-лимфоцитов рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении Prism.

**[0183]** Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела исследовали на их способность активировать покоящиеся Т-лимфоциты человека и яванского макака для уничтожения панели экспрессирующих BCMA клеток с различными уровнями поверхностного BCMA. Используя покоящиеся Т-лимфоциты человека в качестве

эффektorных клеток, REGN5458 опосредовало уничтожение 5 разных клеточных линий ВСМА с значениями  $EC_{50}$  в диапазоне от  $7,07 \times 10^{-10}$  М до  $3,45 \times 10^{-11}$  М. REGN5459 продемонстрировало уничтожение тех же 5 клеточных линий с значениями  $EC_{50}$  в диапазоне от  $1,66 \times 10^{-9}$  М до  $1,06 \times 10^{-10}$  М.  $EC_{50}$  для активации Т-лимфоцитов, как измерено по повышенной экспрессии CD25 на CD8+ Т-лимфоцитах, были аналогичны  $EC_{50}$  уничтожения. Умеренную активацию Т-лимфоцитов наблюдали в присутствии 1-плечевого CD3 изотипного контрольного mAb17664D, но только для клеточной линии U266. Не наблюдали цитотоксичности для исследованных изотипных контролей.

**[0184]** Опосредованное ВСМАхCD3 уничтожение Т-лимфоцитами яванского макака было исследовано только на клеточной линии MM H929.  $EC_{50}$  для цитотоксичности, опосредованной REGN5458 и REGN5459, составляло  $2,34 \times 10^{-11}$  и  $6,92 \times 10^{-11}$  соответственно. Не наблюдали цитотоксичности или активации Т-лимфоцитов для изотипичного контрольного антитела mAb15260 с либо эффektorными клетками человека, либо яванского макака. Результаты показаны в Таблицах 15А, 15В и 16 ниже.

**Таблица 15А: Медианное  $EC_{50}$ , эффektorные клетки человека**

REGN №	H929 (40000 ABC)			MM1S (18000 ABC)			U266 (13000 ABC)		
	n	% Выживаемости	% Т активация	n	% Выживаемости	% Т активация	n	% Выживаемости	% Т активация
REGN5458	3	1,03E-10	2,11E-10	2	6,46E-11	7,06E-11	1	3,28E-10	1,07E-10
REGN5459	4	3,01E-10	3,00E-10	2	2,88E-10	4,58E-10	1	1,66E-09	4,69E-10

**Таблица 15В: Медианное  $EC_{50}$ , эффektorные клетки человека**

REGN №	RPMI8226 (10000 ABC)			Molp8 (2000 ABC)		
	n	% Выживаемости	% Т активация	n	% Выживаемости	% Т активация
REGN5458	1	3,45E-11	6,49E-11	2	7,07E-10	1,10E-9
REGN5459	1	1,06E-10	7,50E-10	3	1,36E-09	6,47E-9

**Таблица 16: Медианное  $EC_{50}$ , эффektorные клетки яванского макака**

REGN №	H929		
	n	% Выживаемости	% Т активация
REGN5458	4	2,34E-11	6,83E-11
REGN5459	4	6,92E-11	1,58E-10

**Пример 9: Анализ цитотоксичности FACS в отношении аутологичного, опосредованного Т-лимфоцитами уничтожения первичных бластных клеток**

### **множественной миеломы в присутствии анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител**

**[0185]** Для наблюдения за специфическим уничтожением клеток множественной миеломы с помощью проточной цитометрии, моноклеарные клетки костного мозга (МККМ) из пациентов с множественной миеломой высевали на стромальные клетки человека (HS5) и оставляли на ночь при 37 °С. Помимо этого, соответствующие моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) пациента размораживали и культивировали в дополненной среде RPMI в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в течение ночи при 37°C для обогащения на лимфоциты за счет разрушения прилипших клеток. На следующий день МККМ совместно инкубировали с наивными МКПК, из числа прилипших разрушенных клеток, на стромальных клетках (HS5) и серийным 10-кратным разведением биспецифического BCMAxCD3 или изотипного контроля с 1-плечом CD3 (начальная концентрация 66,7 нМ) при 37 °С. Клетки извлекали из планшетов для культивирования клеток на 3, 4 или 7 день и анализировали с помощью FACS. Для оценки специфичности уничтожения, клетки множественной миеломы гейтировали исходя из: клетка одиночная, живая, отрицательная по CD90 (для исключения стромальных клеток), отрицательная по CD2 и положительная по CD56. CD45 был низким на клетках множественной миеломы в большинстве образцов, за исключением MM455. Отмечали процент живых целевых клеток для расчета скорректированной выживаемости следующим образом: Скорректированная выживаемость= $(R1/R2) \times 100$ , где R1= % живых целевых клеток в присутствии антитела, а R2=% живых целевых клеток в отсутствие исследуемого антитела.

**[0186]** Т-лимфоциты гейтировали как CD2-положительные, CD56-отрицательные, и CD4- или CD8-положительные. Отмечали активацию Т-лимфоцитов как процент CD25+ CD4 или CD8 Т-лимфоцитов от общего количества CD4 или CD8 Т-лимфоцитов.

**[0187]** Биспецифические антитела BCMAxCD3 были исследованы на их способность перенаправлять уничтожение первичных бластных клеток множественной миеломы аутологичными МКПК донора. Максимальная, опосредованная BCMAxCD3, цитотоксичность в отношении первичной бластной клетки MM варьировала от 52 до 96%, с EC50 в диапазоне от  $9,89 \times 10^{-11}$  М до  $3,67 \times 10^{-9}$  М для REGN5458, и от  $4,96 \times 10^{-10}$  М до  $7,94 \times 10^{-8}$  М для REGN5459. Активацию Т-лимфоцитов измеряли, оценивая повышенную экспрессию CD25 на CD8+ Т-лимфоцитах. Значения EC50 активации Т-лимфоцитов находились в диапазоне от  $3,23 \times 10^{-9}$  до  $1,69 \times 10^{-10}$ . Наблюдали умеренную цитотоксичность и активацию Т-лимфоцитов для изотипного контроля с 1-им плечом к CD3 (отсутствие связывания с мишенью). Результаты показаны в Таблицах 17А и 17В ниже.

**Таблица 17А: MM % лизиса**

<b>ID образ</b>	<b>Стадия болезни</b>	<b>соотношение Э:Ц</b>	<b>продолжительность</b>	<b>% лизиса</b>	<b>% лизиса</b>	<b>% лизиса</b>
			<b>нось</b>			

<b>ца</b>			<b>лечения</b>	<b>ММ при 66 нм REGN5 458</b>	<b>ММ при 66 нм REGN5 459</b>	<b>ММ при 66 нм изотипно го</b>
ММ2	впервые диагностирован а	1,4	7 дней	88	85	27,5
ММ36 9	впервые диагностирован а	0,3	3 дня	96	94	0
ММ45 3	впервые диагностирован а	2,4	3 дня	82	80	40
ММ45 5	прогрессирован ие, лечилось	0,4	3 дня	63	52	24

**Таблица 17В: EC50 лизиса ММ и активация Т-лимфоцитов**

<b>ID образца</b>	<b>Стадия болезни</b>	<b>соотно- шение Э:Ц</b>	<b>продол- житель- ность</b>	<b>ММ лизис EC50 REGN54 58</b>	<b>ММ лизис EC50 REGN54 59</b>	<b>CD25 повыш. экспрес. EC50 REGN54 56</b>	<b>CD25 повыш. экспрес. EC50 REGN54 56</b>
ММ2	впервые диагност и-рована	1,4	7 дней	7,47E-10	7,24E-09	Не выполнен а	Не выполне на
ММ369	впервые диагност и-рована	0,3	3 дня	1,07E-10	4,96E-10	1,69E-10	2,03E-10
ММ453	впервые диагност и-рована	2,4	3 дня	9,89E-11	1,19E-09	1,71E-10	3,23E-9
ММ455	прогресси -рование, лечилось	0,4	3 дня	3,67E-09	7,94E-08	2,06E-10	1,16E-9

**Пример 10: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела предотвращают рост опухолей, экспрессирующих BCMA (NCI-H929) in vivo в модели ксеногенной опухоли**

[0188] Для определения эффективности in vivo BCMAxCD3 биспецифических антител (Ab) было выполнено исследование ксеногенных опухолей. Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 и  $0,5 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, выделенных из обычного донора. Мышам (n=7 в группе) немедленно вводили: контроль - носитель ФСБ, нерелевантное анти-Fcγ2b1 бивалентное Ab - изотипный контроль (REGN2759), биспецифическое Ab - CD3-связывающий контроль (mAb17664D), BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозе 4 мг/кг. Мышам вводили Ab два раза в неделю в течение трех недель, а рост опухоли оценивали в течение 40 дней. В то время как опухоли BCMA<sup>+</sup> росли сходным образом у мышей, которым вводили носитель, изотипный контроль и CD3-связывающий контроль, оба антитела BCMAxCD3, которые исследовали, предотвращали рост опухолей in vivo.

[0189] *Имплантация и измерение сингенных опухолей.* Мышам NSG подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 и  $0,5 \times 10^6$  МКПК, полученных из обычного донора. Мышам (n=7 в группе) немедленно вводили: контроль - носитель ФСБ, нерелевантное анти-Fcγ2b1 бивалентное Ab - изотипный контроль (REGN2759), биспецифическое Ab - CD3-связывающий контроль (mAb17664D), BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозе 4 мг/кг. Мышам вводили Ab два раза в неделю в общей сложности в течение трех недель. Рост опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю в течение всего эксперимента. Мышей умерщвляли через 40 дней после имплантации опухоли.

[0190] *Расчет роста и ингибирования сингенной опухоли.* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм<sup>3</sup>) = (длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

[0191] BCMAxCD3 биспецифические антитела предотвращали рост опухолей BCMA<sup>+</sup> NCI-H929 in vivo в модели ксеногенной опухоли. Результаты показаны в Таблице 18 ниже.

**Таблица 18: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

Антитело (4 мг/кг)	Средний размер опухоли (мм <sup>3</sup> )±СОС в День 4
ФСБ (Контроль носитель)	67,1±5,9

REGN2759 (изотипный контроль)	62,6±3,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	76,1±7,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	39,5±9,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	26,5±6,2
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 7</b>
ФСБ (Контроль носитель)	123,0±25,2
REGN2759 (изотипный контроль)	109,7±20,3
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	182,0±19,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 11</b>
ФСБ (Контроль носитель)	361,5±35,7
REGN2759 (изотипный контроль)	415,3±11,4
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	449,6±46,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 14</b>
ФСБ (Контроль носитель)	581,4±57,9
REGN2759 (изотипный контроль)	734,3±41,8
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	741,2±56,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 18</b>
ФСБ (Контроль носитель)	1033,4±143,7
REGN2759 (изотипный контроль)	1586,1±101,4
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	1511,4±80,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 21</b>

ФСБ (Контроль носитель)	1730,9±244,8
REGN2759 (изотипный контроль)	2554,7±148,8
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	2474,0±132,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 28</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Эвтаназия - не измерено
REGN2759 (изотипный контроль)	Эвтаназия - не измерено
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	Эвтаназия - не измерено
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0
<b>Антитело (4 мг/кг)</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 40</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Эвтаназия - не измерено
REGN2759 (изотипный контроль)	Эвтаназия - не измерено
mAb17664D (CD3-связывающий контроль)	Эвтаназия - не измерено
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0±0

**Пример 11: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела предотвращают рост BCMA-экспрессирующих опухолей (NCI-H929), дозозависимым образом в модели ксеногенной опухоли *in vivo***

[0192] Для определения эффективности *in vivo* анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование ксеногенной опухоли. Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 человека и  $0,5 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, выделенных из обычного, здорового донора. Затем мышам (n=7 в группе) сразу вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 4 мг/кг, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460) в дозе 4 мг/кг, BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab два раза в неделю, всего семь доз, и рост опухоли оценивали в течение 60 дней. В то время как опухоли BCMA<sup>+</sup> NCI-H929 росли сходным образом у мышей, обработанных носителем и CD3-связывающим контролем, оба антитела BCMAxCD3, которые исследовали, предотвращали рост опухолей *in vivo* дозозависимым образом.

**[0193]** *Имплантация и измерение ксеногенных опухолей:* Мышам NSG подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  ВСМА-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 и  $0,5 \times 10^6$  МКПК, полученных из обычного, здорового донора. Мышам (n=7 в группе) сразу вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D), CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460), ВСМАхCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab, или ВСМАхCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab. mAb17664D и REGN4460 вводили в дозе 4 мг/кг, тогда как REGN5458 и REGN5459 вводили в дозе либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили Ab два раза в неделю, всего семь доз. Рост опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю в течение всего эксперимента.

**[0194]** *Расчет роста и ингибирования ксеногенной опухоли:* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм<sup>3</sup>) = (длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

**[0195]** ВСМАхCD3 биспецифические Ab предотвращали рост опухолей ВСМА<sup>+</sup> NCI-H929 дозозависимым образом в этой ксеногенной модели опухоли in vivo. Результаты показаны в Таблице 19 ниже и проиллюстрированы в Фиг. 1 и 2.

**Таблица 19: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 4</b>
ФСБ (Контроль носитель)	60,1±7,9
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	42,5±4,7
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	52,0±5,9
REGN5458 (ВСМАхCD3-G) - 4 мг/кг	18,0±1,2
REGN5458 (ВСМАхCD3-G) - 0,4 мг/кг	31,9±2,0
REGN5458 (ВСМАхCD3-G) - 0,04 мг/кг	32,0±2,9
REGN5459 (ВСМАхCD3-G20) - 4 мг/кг	21,8±3,4
REGN5459 (ВСМАхCD3-G20) - 0,4 мг/кг	19,6±4,4
REGN5459 (ВСМАхCD3-G20) - 0,04 мг/кг	33,0±4,4
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 7</b>
ФСБ (Контроль носитель)	138,2±25,1
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	108,6±17,8
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	132,4±21,1
REGN5458 (ВСМАхCD3-G) - 4 мг/кг	1,3±1,3
REGN5458 (ВСМАхCD3-G) - 0,4 мг/кг	11,3±3,0

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	30,8±5,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	8,0±4,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	7,3±3,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	8,4±4,0
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 12</b>
ФСБ (Контроль носитель)	545,4±88,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	493,4±67,5
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	616,2±84,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1,6±1,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	71,5±22,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	1,7±1,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	0±0
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 15</b>
ФСБ (Контроль носитель)	921,4±147,5
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	874,8±86,6
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	1190,7±91,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	133,4±50,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	7,9±7,9
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 19</b>
ФСБ (Контроль носитель)	1785,3±282,2
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	1833,4±186,6
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	2336,5±188,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	413,7±162,7

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	23,1±23,1
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 22</b>
ФСБ (Контроль носитель)	2601,5±414,5
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	2878,5±257,6
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	3374,3±267,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	669,4±248,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	69,5±69,5
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 26</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1167,0±431,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	156,7±156,7
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 29</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1781,8±620,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	226,6±226,6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 34</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 39</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 42</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 46</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 55</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 60</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены

**Пример 12: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела уменьшают размер и предотвращают рост развившихся BCMA-экспрессирующих опухолей (NCI-H929) дозозависимым образом в модели ксеногенной опухоли in vivo**

[0196] Для определения эффективности in vivo анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование ксеногенной опухоли. Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 человека и  $0,5 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, выделенных из обычного, здорового донора. Опухолям давали возможность расти и развиваться в течение 5 дней, пока они не достигали размера около  $70 \text{ мм}^3$ . Затем в День 5 мышам (n=7-8 в группе) вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 4 мг/кг, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460) в дозе 4 мг/кг, BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab два раза в неделю, всего семь доз, и рост опухоли оценивали в течение 55 дней. В то время как опухоли BCMA<sup>+</sup> NCI-H929 росли сходным образом у мышей, обработанных носителем и CD3-связывающим контролем, оба антитела BCMAxCD3, которые исследовали, уменьшали размер развившихся опухолей и предотвращали рост опухолей in vivo дозозависимым образом.

[0197] *Имплантация и измерение ксеногенных опухолей:* Мышам NSG подкожно имплантировали смесь  $10 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы NCI-H929 и  $0,5 \times 10^6$  МКПК, полученных из обычного, здорового донора. Опухолям давали возможность расти и развиваться в течение 5 дней, пока они не достигали размера около  $70 \text{ мм}^3$ . Затем в День 5 мышам (n=7-8 в группе) вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D), CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460), BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab. mAb17664D и REGN4460 вводили в дозе 4 мг/кг, тогда как REGN5458 и REGN5459 вводили в дозе либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили Ab два раза в неделю, всего семь доз. Рост опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю в течение всего эксперимента.

[0198] *Расчет роста и ингибирования ксеногенной опухоли:* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле:  $\text{Объем (мм}^3\text{)} = (\text{длина} \times \text{ширина}^2) / 2$ .

[0199] Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела уменьшают размер и предотвращают рост развившихся BCMA<sup>+</sup> опухолей (NCI-H929) дозозависимым образом в модели ксеногенной опухоли in vivo. Результаты показаны в Таблице 20 ниже и

проиллюстрированы в Фиг. 3 и 4.

**Таблица 20: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 5</b>
ФСБ (Контроль носитель)	61,5±6,4
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	63,7±5,4
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	62,6±3,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	71,9±10,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	69,3±7,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	58,1±5,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	61,8±5,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	69,5±4,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	74,9±6,4
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 8</b>
ФСБ (Контроль носитель)	124,3±17,3
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	145,3±22,0
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	170,7±15,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	64,7±16,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	120,3±16,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	130,3±16,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	45,8±9,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	171,9±23,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	152,3±20,0
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 12</b>
ФСБ (Контроль носитель)	565,7±64,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	585,0±64,4
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	706,8±46,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	19,5±10,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	262,7±61,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	525,9±71,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	11,5±8,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	233,8±63,5

REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	462,5±57,7
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 15</b>
ФСБ (Контроль носитель)	1150,4±105,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	1041,4±101,3
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	1298,4±71,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	25,6±19,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	476,2±133,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1031,2±164,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	327,2±135,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	1094,2±78,9
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 19</b>
ФСБ (Контроль носитель)	2621,3±190,9
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	2557,5±241,1
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	3383,3±183,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	40,6±32,8
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1347,5±334,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	2467,5±370,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	606,2±288,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	2412,5±184,6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 22</b>
ФСБ (Контроль носитель)	3717,9±214,5
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	3688,9±272,0
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	4492,2±344,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	78,3±60,8
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	2068,5±465,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	3745,7±541,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	815,4±387,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	3285,9±227,3

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 27</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	252,3±185,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	3463,9±1025,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1589,1±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	1849,9±903,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 30</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	411,3±307,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	2144,2±2144,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	2886,5±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	661,8±490,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 35</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	633,5±473,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	996,8±771,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка</b>	<b>Средний размер опухоли</b>

<b>антителом</b>	<b>(мм3)±СОС в День 40</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	369,5±369,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	375,6±375,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм3)±СОС в День 55</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены

**Пример 13: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела предотвращают рост BCMA-экспрессирующих опухолей (MOLP-8), дозозависимым образом в модели ксеногенной опухоли *in vivo***

[0200] Для определения эффективности *in vivo* анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование ксеногенной опухоли. Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) подкожно имплантировали смесь  $5 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы MOLP-8 человека и  $1 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, выделенных из обычного, здорового донора. Затем мышам (n=7 в группе) сразу вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 4 мг/кг, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460) в дозе 4 мг/кг, BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозах либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab два раза в неделю, всего семь доз, и рост опухоли оценивали в течение 56 дней. В то

время как опухоли BCMA<sup>+</sup> MOLP-8 росли сходным образом у мышей, обработанных носителем и CD3-связывающим контролем, оба антитела BCMAxCD3, которые исследовали, предотвращали рост опухолей *in vivo* дозозависимым образом.

**[0201]** *Имплантация и измерение ксеногенных опухолей:* Мышам NSG подкожно имплантировали смесь  $5 \times 10^6$  BCMA-экспрессирующих клеток множественной миеломы MOLP-8 и  $1 \times 10^6$  МКПК, полученных из обычного, здорового донора. Мышам (n=7 в группе) сразу вводили ФСБ носитель - контроль, CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D), CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G20; REGN4460), BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab. mAb17664D и REGN4460 вводили в дозе 4 мг/кг, тогда как REGN5458 и REGN5459 вводили в дозе либо 4 мг/кг, 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили Ab два раза в неделю, всего семь доз. Рост опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю на протяжении эксперимента.

**[0202]** *Расчет роста и ингибирования ксеногенной опухоли:* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм<sup>3</sup>) = (длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

**[0203]** Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела предотвращали рост опухолей BCMA<sup>+</sup> MOLP-8 дозозависимым образом в этой ксеногенной модели опухоли *in vivo*. Результаты показаны в Таблице 21 ниже и проиллюстрированы в Фиг. 5 и 6.

**Таблица 21: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 3</b>
ФСБ (Контроль носитель)	10,3±3,0
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	11,6±2,0
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	14,1±3,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	12,5±1,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	13,5±1,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	9,3±2,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	12,9±1,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	14,0±1,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	11,7±2,1
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 7</b>
ФСБ (Контроль носитель)	73,4±13,5
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	50,0±6,6

REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	45,7±6,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1.0 1,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	18,3±5,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0,6±0,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	37,0±5,7
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 10</b>
ФСБ (Контроль носитель)	249,9±47,6
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	125,0±6,8
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	173,9±99
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	73,9±25,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	104±23,0
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 14</b>
ФСБ (Контроль носитель)	677,0±62,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	530,0±44,6
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	549,1±59,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	255,4±79,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	356,7±84,6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 17</b>
ФСБ (Контроль носитель)	1349,5±149,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	935,3±71,3
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	1027,1±86,6

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	14,5±7,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1,7±1,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	494,3±144,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	645,6±140,9
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 21</b>
ФСБ (Контроль носитель)	2990,9±291,7
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	2249,6±113,5
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	2473,4±170,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	102,7±66,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,3±5,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1373,0±366,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	1442,4±310,7
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 23</b>
ФСБ (Контроль носитель)	4155,1±401,8
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	3288,4±204,6
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	3592,7±224,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	193,3±117,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	9,7±9,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	1882,3±551,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	2124,4±444,1
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 28</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	627,4±318,1

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	47,4±47,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	2542,5±613,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	1,9±1,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	1939,3±840,6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 31</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1018,5±498,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	104,7±92,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	2906,1±532,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	3,8±3,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	2688,7±1176,6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 35</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1342,9±629,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	375,1±307,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	3538,0±0,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	9,3±7,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	612,1±0
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 42</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	2363,0±890,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	968,8±689,2

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	12,8±12,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 49</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1683,5±1683,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	Нет записано
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	Нет записано
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	Нет записано
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 56</b>
ФСБ (Контроль носитель)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN4460 (CD3-связывающий контроль-G20) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	3108,1±3108,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1742,4±635,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 мг/кг	17,2±17,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	0±0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 мг/кг	Животные умерщвлены

**Пример 14: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела замедляют рост BCMA-экспрессирующих опухолей (MOLP-8) в модели ксеногенной опухоли *in vivo***

[0204] Для определения эффективности *in vivo* анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование ксеногенной опухоли. В День -11 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) внутрибрюшинно инъецировали  $4 \times 10^6$  моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека из обычного, здорового донора. В День 0 мышам внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  BCMA<sup>+</sup> опухолевых клеток множественной миеломы MOLP-8 человека, которые были

сконструированы для экспрессии люциферазы светлячка (клетки MOLP-8-люцифераза). Затем мышам (n=5 в группе) сразу вводили CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 4 мг/кг или ВСМАхCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе 4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 3 и 7, всего три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 48 дней путем измерения биолюминесценции опухоли (БЛЕ) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) давали только клетки MOLP-8-люцифераза, но не МКПК или антитела. Чтобы измерить фоновые уровни БЛЕ, группа мышей (n=5) не получала лечения и не получала опухолей, МКПК или антитела. В то время как опухоли ВСМА<sup>+</sup> MOLP-8-люцифераза постепенно росли у мышей, получавших CD3-связывающий контроль, лечение Ab ВСМАхCD3 с помощью REGN5458 замедляло рост опухолей *in vivo*.

**[0205]** *Имплантация и измерение ксеногенных опухолей:* В День -11 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) внутрибрюшинно инъецировали  $5 \times 10^6$  МКПК человека из обычного, здорового донора. В День 0 мышам внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  клеток ВСМА<sup>+</sup> MOLP-8-люцифераза. Затем мышам (n=5 в группе) сразу вводили CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 4 мг/кг или ВСМАхCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе 4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 3 и 7, всего три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 48 дней путем измерения БЛЕ опухоли у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) давали только клетки MOLP-8-люцифераза, но не МКПК или антитела. Чтобы измерить фоновые уровни БЛЕ, группа мышей (n=5) не получала лечения и не получала опухолей, МКПК или антитела.

**[0206]** *Измерение роста ксеногенной опухоли:* для измерения опухолевой нагрузки использовали визуализацию БЛЕ. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы - D-люциферина, суспендированного в ФСБ. Через пять минут после этой инъекции визуализацию БЛЕ мышей проводили под изофлурановой анестезией с использованием системы Xenogen IVIS. Получение изображения осуществлялось с помощью поля зрения на D, высотой субъекта 1,5 см и средним уровнем биннинга (binning) с автоматическим временем экспозиции, определяемым Living Image Software. Сигналы БЛЕ были получены с использованием программного обеспечения Living Image: интересные области были нарисованы вокруг каждой опухолевой массы, и фотонные интенсивности были записаны как  $\phi/\text{с}/\text{см}^2/\text{ср}$ .

**[0207]** Анти-ВСМА х анти-CD3 биспецифическое антитело REGN5458 замедляло рост опухолей ВСМА<sup>+</sup> MOLP-8-люцифераза в этой модели ксеногенной опухоли *in vivo*. Результаты показаны в Таблице 22 ниже.

**Таблица 22: Средний размер опухоли (по яркости) в различные моменты времени**

Обработка	Яркость [ $\phi/\text{с}/\text{см}^2/\text{ср}$ ] через 8
-----------	---

<b>антителом</b>	<b>дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	4,93E+05 ± 1,66E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	5,73E+05 ± 5,27E+04
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	6,08E+05 ± 5,16E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	5,66E+05 ± 1,97E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 15 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	5,37E+05 ± 1,46E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	1,24E+06 ± 9,67E+04
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	1,61E+06 ± 9,64E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	5,28E+05 ± 4,13E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 22 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,00E+05 ± 1,03E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	1,23E+07 ± 1,02E+06
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	1,98E+07 ± 8,86E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1,08E+06 ± 1,71E+05
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 24 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	5,24E+05 ± 1,86E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	1,56E+07 ± 1,29E+06
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	5,26E+07 ± 1,91E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1,02E+06 ± 1,99E+05
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 28 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,09E+05 ± 2,28E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	3,01E+07 ± 4,78E+06
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	5,69E+07 ± 2,77E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	3,56E+06 ± 6,34E+05

<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 30 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,44E+05 ± 4,56E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	6,92E+06 ± 1,40E+06
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 34 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,78E+05 ± 3,02E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	2,65E+07 ± 1,36E+07
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 37 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,59E+05 ± 2,96E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	4,52E+07 ± 1,40E+07
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 43 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,26E+05 ± 4,18E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	1,06E+08 ± 3,43E+07
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 48 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	8,24E+05 ± 1,73E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 4 мг/кг	Животные умерщвлены

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 мг/кг	3,22E+08 ± 1,27E+08
---------------------------------	---------------------

**Пример 15: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела снижают опухолевую нагрузку (OPM-2) до фоновых уровней in vivo**

**[0208]** Для определения эффективности in vivo анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование ксеногенной опухоли. В День 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  BCMA<sup>+</sup> опухолевых клеток множественной миеломы OPM-2 человека, которые были сконструированы для экспрессии люциферазы светлячка (клетки OPM-2-люцифераза). В День 10 мышам внутрибрюшинно инъецировали  $4 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека из обычного, здорового донора. В День 21, мышам (n=5 в группе) вводили CD3-связывающее контрольное антитело Ab (G; mAb17664D) в дозе 0,4 мг/кг, BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе 0,4 мг/кг, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозе 0,4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 25 и 28, всего три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 61 дня путем измерения билюминесценции опухоли (БЛЕ) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) давали только клетки OPM-2-люцифераза, но не МКПК или антитела. Чтобы измерить фоновые уровни БЛЕ, группа мышей (n=5) не получала лечения и не получала опухолей, МКПК или антитела. В то время как опухоли BCMA<sup>+</sup> OPM-2-люцифераза постепенно росли у мышей, получавших CD3-связывающий контроль, лечение Ab BCMAxCD3 с помощью REGN5458 и REGN5459 уменьшало опухолевую нагрузку до исходных уровней у большинства животных.

**[0209]** *Имплантация и измерение ксеногенных опухолей:* В День 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  BCMA<sup>+</sup> опухолевых клеток множественной миеломы OPM-2 человека, которые были сконструированы для экспрессии люциферазы светлячка (клетки OPM-2-люцифераза). В День 10 мышам внутрибрюшинно инъецировали  $4 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека из обычного, здорового донора. В День 21, мышам (n=5 в группе) вводили CD3-связывающее контрольное антитело Ab (G; mAb17664D) в дозе 0,4 мг/кг, BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе 0,4 мг/кг, или BCMAxCD3 (G20; REGN5459) биспецифическое Ab в дозе 0,4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 25 и 28, всего три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 61 дня путем измерения билюминесценции опухоли (БЛЕ) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) давали только клетки OPM-2-люцифераза, но не МКПК или антитела. Чтобы измерить фоновые уровни БЛЕ, группа мышей (n=5) не получала лечения и не получала опухолей, МКПК или антитела.

**[0210]** *Измерение роста ксеногенной опухоли:* для измерения опухолевой нагрузки использовали визуализацию БЛЕ. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы - D-люциферина, суспендированного в ФСБ. Через пять минут после этой

инъекции визуализацию БЛЕ мышей проводили под изофлурановой анестезией с использованием системы Xenogen IVIS. Получение изображения осуществлялось с помощью поля зрения на D, высотой субъекта 1,5 см и средним уровнем биннинга (binning) с автоматическим временем экспозиции, определяемым Living Image Software. Сигналы БЛЕ были получены с использованием программного обеспечения Living Image: интересующие области были нарисованы вокруг каждой опухолевой массы, и фотонные интенсивности были записаны как  $\text{ф/с/см}^2/\text{ср}$ .

[0211] В то время как опухоли BCMA<sup>+</sup> OPM-2-люцифераза постепенно росли у мышей, получавших CD3-связывающий контроль, лечение Ab BCMAxCD3 с помощью REGN5458 и REGN5459 уменьшало опухолевую нагрузку до исходных уровней у большинства животных. Результаты показаны в Таблице 23 ниже и проиллюстрированы в Фиг. 7.

**Таблица 23: Средний размер опухоли (по яркости) в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 5 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	5,62E+05 ± 2,75E+04
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	5,73E+05 ± 3,02E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,87E+05 ± 2,40E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	5,09E+05 ± 3,56E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 11 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	6,22E+05 ± 3,34E+04
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	6,25E+05 ± 3,80E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	6,19E+05 ± 4,39E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	6,45E+05 ± 2,39E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 20 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	2,32E+06 ± 2,94E+05
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	2,36E+06 ± 5,46E+05

REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1,81E+06 ± 2,37E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	2,13E+06 ± 1,69E+05
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 26 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	5,96E+06 ± 8,74E+05
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	6,05E+06 ± 1,32E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1,73E+06 ± 8,69E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	1,28E+06 ± 7,36E+05
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 31 день после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	1,58E+07 ± 4,84E+06
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	1,35E+07 ± 2,35E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	3,50E+06 ± 2,42E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	1,98E+06 ± 1,36E+06
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 34 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	3,36E+07 ± 1,27E+07
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	2,35E+07 ± 5,72E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	4,85E+06 ± 3,24E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	4,24E+06 ± 3,69E+06
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 38 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	3,91E+07 ± 6,87E+06
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	4,84E+07 ± 1,65E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,30E+06 ± 3,44E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	3,21E+06 ± 2,52E+06

<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 40 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,06E+06 ± 3,36E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	3,84E+06 ± 3,34E+06
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 47 дней после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	7,76E+05 ± 7,85E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	7,34E+05 ± 2,62E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 54 дня после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,78E+05 ± 1,15E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	6,41E+05 ± 5,96E+04
<b>Обработка антителом</b>	<b>Яркость [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] через 61 день после имплантации (среднее ± СОС)</b>
Без опухоли (фоновая БЛЕ)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Без МКПК/антитела (положительный контроль)	Животные умерщвлены
mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	Животные умерщвлены
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	5,23E+05 ± 4,10E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 мг/кг	6,03E+05 ± 5,29E+04

**Пример 16: BCMAxCD3 биспецифические антитела подавляют рост сингенных опухолей in vivo дозозависимым образом**

**[0212]** Для определения эффективности *in vivo* анти-BCMA x анти-CD3 биспецифических антител (Ab) выполняли исследование сингенной опухоли у мыши, экспрессирующей CD3 человека. Мышам C57BL/6, которые экспрессируют CD3deg человека вместо CD3deg мыши (CD3-гуманизированные мыши), подкожно имплантировали либо  $0,5 \times 10^6$  клеток меланомы B16, которые были сконструированы для экспрессии полноразмерного BCMA человека (клетки B16/BCMA), либо  $1 \times 10^6$  клеток карциномы толстой кишки MC38, которые были сконструированы для экспрессии полноразмерного BCMA человека (MC38/BCMA). Затем мышам (n=7 в группе) сразу вводили CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 0,4 мг/кг или BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе либо 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 4 и 7, всего три дозы, и оценивали рост опухоли в течение эксперимента. В то время как опухоли B16/BCMA и опухоли MC38/BCMA росли у мышей, получавших CD3-связывающий контроль, BCMAxCD3 REGN5458 было способно подавлять рост обеих опухолевых линий *in vivo* дозозависимым образом.

**[0213]** *Имплантация и измерение сингенных опухолей:* Мышам C57BL/6, которые экспрессируют CD3deg человека вместо CD3deg мыши (CD3-гуманизированные мыши), подкожно имплантировали либо  $0,5 \times 10^6$  клеток меланомы B16F10, которые были сконструированы для экспрессии полноразмерного BCMA человека (клетки B16/BCMA), либо  $1 \times 10^6$  клеток карциномы толстой кишки MC38, которые были сконструированы для экспрессии полноразмерного BCMA человека (MC38/BCMA). Затем мышам (n=7 в группе) сразу вводили CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; mAb17664D) в дозе 0,4 мг/кг или BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозе либо 0,4 мг/кг, либо 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 4 и 7, всего три дозы, и оценивали рост опухоли в течение эксперимента.

**[0214]** *Расчет роста и ингибирования сингенной опухоли:* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм<sup>3</sup>) = (длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

**[0215]** В то время как опухоли B16/BCMA и опухоли MC38/BCMA росли у мышей, получавших CD3-связывающий контроль, BCMAxCD3 REGN5458 было способно подавлять рост обеих опухолевых линий *in vivo* дозозависимым образом. Результаты показаны в Таблице 24 ниже.

**Таблица 24: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

Обработка антителом	Средний размер опухоли (мм <sup>3</sup> )±СОС в День 5
Опухоль B16/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	25,6±2,7

Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0,0±0,0
Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	3,3±2,2
Опухоль MC38/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	29,3±4,4
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	1,4±1,4
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	11,9±2,9
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 10</b>
Опухоль В16/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	179,2±30,6
Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0,0±0,0
Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	15,4±12,5
Опухоль MC38/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	123,1±14,6
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	0,0±0,0
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	66,7±22,5
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 14</b>
Опухоль В16/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	763,1±156,2
Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	8,1±4,4
Опухоль В16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	81,4±49,2
Опухоль MC38/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	477,1±77,1

Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	2,9±2,9
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	273,3±115,3
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 18</b>
Опухоль B16/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	2068,9±357,7
Опухоль B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	47,1±17,0
Опухоль B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	127,2±63,9
Опухоль MC38/BCMA mAb17664D (CD3-связывающий контроль-G) - 0,4 мг/кг	1432,5±231,6
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 мг/кг	7,5±7,5
Опухоль MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 мг/кг	641,5±309,8

**Пример 17: Картирование эпитопа связывания REGN5458 с BCMA с помощью водородно-дейтериевого обмена**

[0216] Картирование эпитопа на основе H/D-обмена с помощью масс-спектрометрии (HDX-MS) выполняли для определения аминокислотных остатков BCMA (рекомбинантный BCMA человека, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 115), взаимодействующих с REGN5458 (BCMA x CD3 биспецифическое антитело). Общее описание способа обмена H/D изложено, например, в Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A.

[0217] Эксперименты HDX-MS проводились на интегрированной платформе HDX/MS, состоящей из системы Leaptec HDX PAL для мечения дейтерием и гашения, Waters Acquity M-Class (вспомогательный менеджер растворителей) для расщепления и загрузки образцов, Waters Acquity M-Class (µBinary менеджер растворителей) для аналитического градиента и ThermoQ Exactive HF масс-спектрометр для измерения массы пептидов.

[0218] Раствор для мечения готовили в виде буфера ФСБ в D<sub>2</sub>O при рD 7,0 (10 мМ фосфатный буфер, 140 мМ NaCl и 3 мМ KCl, что эквивалентно рН 7,4 при 25 °C). Для мечения дейтерием 10 мкл hBCMA.hFc (REGN2746, 54,5 мкМ; SEQ ID NO: 120 или hBCMA.hFc, предварительно смешанного с REGN5458 в молярном соотношении 1:2 (комплекс Ag-Ab), инкубировали при 20°C с 90 мкл D<sub>2</sub>O раствора для мечения, для

различных моментов времени в дубликатах (например, недеитерированный контроль=0 секунд; меченый дейтерием в течение 5 минут и 10 минут). Реакцию дейтерирования гасили добавлением 100 мкл предварительно охлажденного буфера для гашения (0,5 М ТСЕР-НСl, 8 М мочевины и 1% муравьиная кислота) к каждому образцу с 5-минутной инкубацией при 20 °С. Затем погашенный образец вводили в Waters HDX Manager для онлайн-расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды разделяли на колонке C8 (1,0 мм x 50 мм, NovaBioassays) с 13-минутным градиентом от 10% до 32% В (мобильная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты в воде, мобильная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали масс-спектрометрией Q Exactive HF в режиме ЖХ-МС/МС или ЖХ-МС.

**[0219]** Данные ЖХ-МС/МС недеитерированного образца ВСМА сравнивали с базой данных, включая ВСМА и его рандомизированную последовательность, используя поисковый движок Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска (в ELN) были установлены по умолчанию с использованием неспецифического ферментативного расщепления и гликозилирования человека в качестве общей переменной модификации. Список идентифицированных пептидов был затем импортирован в программное обеспечение HDX Workbench (версия 3.3) для расчета захвата дейтерия каждым пептидом, обнаруженного с помощью ЖХ-МС для всех дейтерированных образцов. Для данного пептида центр массы (средневзвешенная масса по интенсивности) в каждый момент времени использовался для расчета захвата дейтерия (D) и процента захвата дейтерия (%D):

Поглощение дейтерия (поглощение D)	=	Средняя масса (дейтерированная) - Средняя масса (недейтерированная)
		D-захват пептида в каждый момент времени X 100%
Процент захвата дейтерия (%D)	=	Максимальный D-захват пептида (определяется в ELN)

**[0220]** Всего было идентифицировано 8 пептидов из hBCMA.hFc, из как только hBCMA.hFc, так и из hBCMA.hFc в комплексе с образцами REGN5458, что составляет 100% покрытие последовательности hBCMA. Среднее среднеквадратическое отклонение (CO) всех пептидов было оценено как 1,4% (подробные расчеты были определены в ELN и Pascal, BD et al (2012) Journal of the American Society for Mass Spectrometry 23(9):1512-1521). Следовательно, любой пептид, который демонстрировал значения дифференциального захвата D выше 4,2% (в 3 раза выше среднего среднеквадратического отклонения), был определен как значительно защищенный. Для hBCMA.hFc пептиды, соответствующие аминокислотам 1-43 SEQ ID NO: 106 (MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA; SEQ ID NO: 121), были значительно защищены REGN5458. Защита этих остатков с помощью REGN5458 была подтверждена с использованием hBCMA.mmH (REGN2744, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 106).

**Таблица 25: Выбранные пептиды ВСМА.hFc со значительной защитой при связывании с REGN5458**

Остатки ВСМА	5 мин			10 минут			-hFc
	REGN274 6	REGN274 6 + REGN545 8		REGN274 6	REGN274 6 + REGN545 8		
	Центр МН +	Центр МН +	$\Delta D$	Центр МН +	Центр МН +	$\Delta D$	$\Delta\%D$
1-28	3217,16	3212,39	-4,77	3218,05	3212,62	-5,43	-25,2
4-26	2582,03	2577,26	-4,77	2582,71	2577,45	-5,26	-31
27-43	1921,75	1920,69	-1,06	1922,1	1920,83	-1,27	-11,1

**Пример 18: FACS-анализ связывания ВСМАхCD3 биспецифических антител и дополнительных антител ВСМА на клеточных линиях множественной миеломы после инкубации в течение ночи с анти-ВСМА антителами**

[0221] Анализ проточной цитометрией использовали для определения влияния инкубации в течение ночи множественных линий миеломных клеток с анти-ВСМА антителами на уровень поверхностного ВСМА. Клеточные линии MM (H929, Molp8, U266 и MM1.S) промывали два раза и культивировали при 37°C в среде R10 (RPMI+10% ФБС+пениц./стрептом./глут.), содержащей 66,7 или 667 нМ анти-ВСМА антитела, DAPT (ингибитор гамма-секретазы) или только среду. Через 18 часов лунки промывали холодным раствором для промывания FACS (ФСБ+ 1% отфильтрованная ФБС) и ресуспендировали в 667 нМ того же анти-ВСМА антитела в холодном буфере для окрашивания (Miltenyi 130-091-221) в течение 30 минут на льду. После инкубации клетки дважды промывали холодным раствором для промывки FACS (ФСБ+ 1% отфильтрованная ФБС), и связанное антитело выявляли путем инкубирования с подходящим вторичным анти-человеческим антителом (анти-hIgG или анти-HIS) на льду в течение дополнительных 30-45 минут. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% отфильтрованную ФБС, и анализировали с помощью проточной цитометрии на BD FACS Canto II. Кратное увеличение окрашивания рассчитывали путем деления СИФ окрашенных клеток, предварительно инкубированных в течение ночи в антителах к ВСМА или DAPT, на СИФ окрашенных клеток, которые инкубировали в течение ночи только в среде.

[0222] ВСМА быстро отщепляют от поверхности клеток ферментом гамма-секретазой. Инкубация в течение ночи с ингибиторами гамма-секретазы, такими как DAPT, предотвращает расщепление ВСМА, что приводит к увеличению уровней ВСМА на поверхности клеток. В Таблицах 26-29 показано кратное увеличение средней

интенсивности флуоресценции (СИФ) ВСМА на клетках, инкубированных в течение ночи с анти-ВСМА антителами или DAPT, по сравнению с клетками, которые инкубировали только в среде. Мы наблюдали, что инкубация в течение ночи с DAPT увеличивала уровни ВСМА, обнаруживаемые анти-ВСМА антителами (ВСМАхCD3 биспецифическим R5458, исходным антителом ВСМА mAb15281, и другими антителами к ВСМА собственного производства) на H929, Molp8, U266 и MM.1S, в 2,3-4 раза, 2,4-8,6 раза, 5,3-9,0 раза и 11,9 раза, соответственно.

[0223] Следует отметить, что мы также наблюдали, что инкубация в течение ночи клеточных линий MM с 66,7 или 667 нМ REGN5458 или исходного бивалентного анти-ВСМА антитела mAb21581 аналогичным образом приводила к повышенным уровням поверхностного ВСМА, обнаруживаемым с помощью FACS, из чего можно сделать вывод, что связывание анти-ВСМА антител предотвращает расщепление ВСМА гамма-секретазой. Индуцированное антителами увеличение уровней поверхностного ВСМА различается в зависимости от линии клеток, с большим кратным увеличением на клетках Molp8 и MM1S по сравнению с H929 или U266. Этот феномен не ограничивался REGN5458, так как он также наблюдался с другими антителами ВСМА собственного изготовления.

**Таблица 26: Кратное изменение СИФ для клеток, инкубированных только в среде (NCI-H929)**

NCI-H929		67 нМ		667 нМ		DAPT	
		Среднее	n	Среднее	n	Среднее	n
mAb21581	аВСМА (исходное для R5458)	1,2	5	1,4	3	3,5	6
REGN5458	ВСМАхCD3	2,0	3	3,0	1	4,0	3
mAb16749	аВСМА	1,0	2	0,8	1	2,3	3
mAb16711	аВСМА	2,8	2	2,1	1	3,8	3
mAb16747	аВСМА	1,8	2	2,1	1	3,9	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,0	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,3	2	1,0	1	1,1	3

**Таблица 27: Кратное изменение СИФ для клеток, инкубированных только в среде (Molp8)**

Molp8		67 нМ		667 нМ		DAPT	
		Среднее	n	Среднее	n	Среднее	n
mAb21581	аВСМА (исходное для R5458)	2,3	5	3,7	3	6,3	6

REGN5458	BCMAxCD3	2,3	3	4,5	1	8,6	3
mAb16749	aBCMA	1,1	2	3,4	1	4,0	3
mAb16711	aBCMA	3,5	2	3,0	1	5,1	3
mAb16747	aBCMA	2,2	2	0,6	1	6,2	3
REGN960	scFv IsoC	1,1	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,3	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	0,9	2	1,2	1	1,0	3

**Таблица 28: Кратное изменение СИФ для клеток, инкубированных только в среде (U266)**

U266		67 нМ		667 нМ		DAPT	
		Среднее	n	Среднее	n	Среднее	n
mAb21581	aBCMA (исходное для R5458)	1,8	2	2,3	1	6,7	6
REGN5458	BCMAxCD3	1,4	2	2,3	1	9,0	3
mAb16749	aBCMA	1,3	2	1,2	1	5,3	3
mAb16711	aBCMA	2,2	2	2,2	1	7,2	3
mAb16747	aBCMA	1,5	2	1,7	1	8,3	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,1	2	1,1	1	1,4	3

**Таблица 29: Кратное изменение СИФ для клеток, инкубированных только в среде (MM1S)**

MM1S		67 нМ		667 нМ		DAPT	
		Среднее	n	Среднее	n	Среднее	n
mAb21581	aBCMA (исходное для R5458)	7,3	2	7,0	2	11,9	2

**Пример 19: Аутологичное уничтожение плазматических клеток человека и яванского макака, опосредованное Т-лимфоцитами, в присутствии биспецифических антител BCMAxCD3**

[0224] Специфическое уничтожение обогащенных CD138<sup>+</sup> плазматических клеток человека или яванского макака нестимулированными аутологичными Т-лимфоцитами оценивали с помощью проточной цитометрии. Аспираты костного мозга и кровь человека или яванского макака получали в течение 24 часов после сбора. Плазматические клетки

CD138<sup>+</sup> были обогащены из костного мозга путем положительной селекции с использованием набора EasySep Human CD138<sup>+</sup> Positive Selection Kit в соответствии с инструкциями производителя. МКПК из цельной крови выделяли с помощью разделения по плотности. МКПК метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Vybrant CFDA-SE. После мечения  $1 \times 10^4$  обогащенных CD138<sup>+</sup> плазматических клеток помещали в 96-луночные плашки с круглым дном при соотношении Э:Ц 10:1 с МКПК, меченными Vybrant CFDA-SE, и серийными разведениями REGN5458, CD3-связывающего контрольного bsAb или ВСМА-связывающего контрольного mAb в течение 72 часов при 37°C в полной среде. В конце культивирования выжившие плазматические клетки CD138<sup>+</sup> анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием устранимого красителя LIVE/DEAD и специфичных для плазматических клеток маркеров клеточной поверхности. Процент жизнеспособности нормализовали к контрольным условиям (плазматические клетки только в присутствии МКПК). Активацию Т-лимфоцитов оценивали с помощью проточной цитометрии. Активация указывается как процент CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> или CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25. Процент активации Т-лимфоцитов был нормализован к контрольным условиям (плазматические клетки только в присутствии МКПК).

**[0225]** В исследованиях *in vitro* оценивали влияние REGN5458 или отрицательных контролей (ВСМА-связывающее контрольное mAb или CD3-связывающее контрольное bsAb) на активацию первичных Т-лимфоцитов человека и яванского макака, и цитотоксичность аутологичных плазматических клеток. Значения EC<sub>50</sub> для цитотоксичности и процента активации Т-лимфоцитов для каждого донора сведены в Таблицу 30.

**[0226]** REGN5458 опосредовало цитотоксичность первичных плазматических клеток человека из доноров 1 и 2 в присутствии аутологичных Т-лимфоцитов, в зависимости от концентрации, со значениями EC<sub>50</sub> 42,8 и 191 пМ, соответственно, и приводило к максимальному проценту цитотоксичности, составляющему 91% и 89%, соответственно. Помимо этого, REGN5458 опосредует активацию Т-лимфоцитов в присутствии плазматических клеток человека из доноров 1 и 2, в зависимости от концентрации, со значениями EC<sub>50</sub>, составляющими 214 и 860 пМ для активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, соответственно, и максимальным процентом активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, составляющим 2% и 36%, соответственно. Цитотоксичность плазматических клеток у обоих доноров и повышенную активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у донора 2 наблюдали только при наномолярных концентрациях CD3-связывающего контроля. Никакого влияния на цитотоксичность или активацию Т-лимфоцитов не наблюдали с ВСМА-связывающим контролем при любой из концентраций, протестированных у любого из доноров.

**[0227]** REGN5458 опосредует цитотоксичность первичных плазматических клеток яванского макака у обоих доноров в зависимости от концентрации; EC<sub>50</sub>, составляющее 1,31 нМ, было рассчитано для донора 1, однако EC<sub>50</sub> не смогли определить для донора 2.

У обеих доноров обработка REGN5458 привела к повышенной цитотоксичности плазматических клеток (максимальный процент цитотоксичности 94% и 91% для доноров 1 и 2, соответственно). Помимо этого, REGN5458 опосредует активацию Т-лимфоцитов в присутствии плазматических клеток яванского макака из доноров 1 и 2, в зависимости от концентрации, со значениями  $EC_{50}$ , составляющими 28,1 нМ и 18,1 нМ для активации  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, и 22,4 нМ и 76,7 нМ для активация  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, соответственно. В результате максимальный процент активации Т-лимфоцитов составил 9% и 16% для  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, и 12% и 17%  $CD8^+$  Т-лимфоцитов для доноров 1 и 2, соответственно.

[0228] Не наблюдали уничтожение целевых клеток с ВСМА-связывающим контролем при любой концентрации, исследованной в любой из оцениваемых клеточных линий. Некоторое уничтожение целевых клеток и активацию Т-лимфоцитов в присутствии плазматических клеток из донора 2 наблюдали с CD3-связывающим контролем при наномолярных концентрациях.

**Таблица 30: Значения  $EC_{50}$  для цитотоксичности и процента активации Т-лимфоцитов для каждого донора**

Клеточные линии		Цитотоксическое уничтожение		Активация Т-лимфоцитов (% повышенной экспрессии CD25)			
				CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты		CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты	
Эффектор-клетки	Целевые клетки	$EC_{50}$ (М)	Макс. % цитотоксичности	$EC_{50}$ (М)	% активации	$EC_{50}$ (М)	% активации
Первичные Т-лимфоциты человека	Плазматические клетки донора 1 человека	$4,28 \times 10^{-11}$	91	НО	НО	$2,14 \times 10^{-10}$	2
	Плазматические клетки донора 2 человека	$1,91 \times 10^{-10}$	89	НО	НО	$8,60 \times 10^{-10}$	36
Первичные Т-лимфоциты яванского макака <sup>a</sup>	Плазматические клетки донора 1 яванского макака	$1,31 \times 10^{-9}$	94	$2,81 \times 10^{-8}$	9	$2,24 \times 10^{-8}$	12
	Плазматические клетки донора 2 яванского макака	НО	91	$\sim 1,81 \times 10^{-8}$	16	$7,67 \times 10^{-8}$	17

<sup>a</sup> Аутологичные плазматические клетки были исследованы для каждого донора.

**Пример 20: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела действуют синергетически с анти-PD-1 антителами для повышения противоопухолевой эффективности in vivo**

[0229] Чтобы определить, обладают ли BCMAxCD3 биспецифические антитела (Ab) синергизмом с блокадой PD-1 для обеспечения лучшей противоопухолевой эффективности in vivo, было проведено исследование сингенной опухоли на мышах, экспрессирующих CD3 человека. Результаты демонстрируют, что комбинация REGN5458 плюс блокада PD-1 обеспечивает лучшую противоопухолевую эффективность, чем REGN5458 или блокада PD-1 по отдельности.

[0230] *Имплантация и измерение сингенных опухолей:* Мышам C57BL/6, которые экспрессируют CD3deg человека вместо CD3deg мыши (CD3-гуманизированные мыши), подкожно имплантировали  $1 \times 10^6$  клеток карциномы толстой кишки MC38, которые были сконструированы для экспрессии полноразмерного BCMA человека (MC38/BCMA). Опухолям позволяли развиваться в течение 3 дней, во время которых мышам (n=6 или 7 в группе) вводили CD3-связывающее контрольное биспецифическое Ab (G; H4sH17664D) в дозе 0,4 мг/кг или BCMAxCD3 (G; REGN5458) биспецифическое Ab в дозах либо 0,04 мг/кг, либо 0,24 мг/кг, вместе с либо заменяющим анти-мышиним PD-1 антителом (Clone RPM1-14) в дозе 4 мг/кг, либо изотипным контрольным Ab (Clone 2A3) в дозе 4 мг/кг. Конкретные группы лечения показаны в Таблице 31 ниже.

**Таблица 31: Группы лечения**

Группа	Биспецифическое лечение	Антитело	n
1	H4SH17664D (0,24 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	7
2	H4SH17664D (0,24 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	7
3	REGN5458 (0,04 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	7
4	REGN5458 (0,04 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	7
5	REGN5458 (0,24 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	6
6	REGN5458 (0,24 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	6

[0231] Мышам вводили эти Ab еще дважды в День 7 и 11, всего три дозы, и оценивали рост опухоли в течение эксперимента.

[0232] *Расчет роста и ингибирования сингенной опухоли:* Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм<sup>3</sup>) = (длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

[0233] Результаты демонстрируют, что комбинация REGN5458 плюс блокада PD-1 обеспечивает лучшую противоопухолевую эффективность, чем REGN5458 или блокада PD-1 по отдельности. В частности, результаты демонстрируют, что в День 24 (последний день, для которого собирали данные для всех групп лечения) комбинация BCMAxCD3

биспецифического антитела и анти-PD-1 антитела оказывала статистически значимый синергетический терапевтический эффект в отношении ингибирования опухолевого роста (Таблица 32, ВСМАхCD3 в дозе 0,04 мг/кг и анти-PD-1 в дозе 4 мг/кг). Используя двухфакторный дисперсионный анализ в День 24,  $p < 0,0001$  между (i) REGN5458 (0,04 мг/кг) + изотип и комбинацией REGN5458 (0,04 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 3 в сравнение с группой 4), (ii) REGN5458 (0,24 мг/кг) + изотип и комбинацией REGN5458 (0,24 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 5 по сравнению с группой 6), (iii) анти-PD-1 и комбинацией REGN5458 (0,04 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 2 по сравнению с группой 6). Используя двухфакторный дисперсионный анализ в День 24,  $p = 0,0005$  между анти-PD-1 и комбинацией REGN5458 (0,04 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 2 по сравнению с группой 4). Увеличение дозы ВСМАхCD3 биспецифического антитела (0,24 мг/кг) в комбинации с блокадой PD-1 приводило к ингибированию опухоли, сравнимому с более низкой дозой биспецифического антитела плюс блокада PD-1 в данном эксперименте. Продемонстрированный синергизм с более низкой дозой биспецифического антитела является преимуществом, поскольку использование более низкой дозы снижает риск любых неблагоприятных побочных эффектов. Точно так же комбинация ВСМАхCD3 биспецифического антитела и анти-PD-1 антитела показала синергетический терапевтический эффект при обеих дозах биспецифического антитела (0,04 мг/кг и 0,24 мг/кг) в группе мышей без опухолей в конце эксперимента (День 28), как показано в Таблице 33.

**Таблица 32: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 3</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	16,30 ± 1,50 n=7
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	14,34 ± 1,17 n=7
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	15,62 ± 1,61 n=7
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	19,20 ± 2,94 n=7
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	13,13 ± 3,12 n=6
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	20,41 ± 3,15 n=6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 7</b>

CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	55,78 ± 6,61 n=7
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	43,59 ± 8,32 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	37,98 ± 3,93 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	30,30 ± 6,47 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	29,27 ± 5,00 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	29,18 ± 3,65 n=6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 11</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	145,74 ± 21,37 n=7
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	45,33 ± 11,46 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	112,53 ± 17,39 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	8,81 ± 0,88 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	36,63 ± 14,89 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	12,99 ± 4,35 n=6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 14</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	414,28 ± 46,72 n=7
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	49,50 ± 17,02 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	438,16 ± 59,56 n=7

BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	6,86 ± 3,90 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	224,33 ± 47,04 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	22,75 ± 17,62 n=6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 18</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1035,43 ± 123,41 n=6
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	100,83 ± 41,62 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1040,12 ± 61,95 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	7,81 ± 7,81 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	515,15 ± 115,38 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	57,79 ± 43,62 n=6
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 21</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1834,87 ± 639,56 n=2
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	208,29 ± 91,80 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	2133,12 ± 129,26 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	21,13 ± 21,13 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1225,47 ± 289,39 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	113,69 ± 85,39 n=6

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 24</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	2358,81 ± 0,00 n=1
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	534,03 ± 205,49 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	3648,37 ± 536,71 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	53,52 ± 53,52 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1493,26 ± 973,01 n=2
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	54,29 ± 54,29 n=5
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 28</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	Все животные умерщвлены n=0
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	1196,57 ± 467,34 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	Все животные умерщвлены n=0
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	141,68 ± 141,68 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1371,17 ± 0,00 n=1
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	104,44 ± 104,44 n=5

**Таблица 33: Мыши без опухолей в конце эксперимента**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Количество мышей без опухолей в конце эксперимента (День 28)</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	0 из 7

CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	2 из 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	0 из 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	6 из 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	0 из 6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	4 из 6

**Пример 21: Анти-BCMA x анти-CD3 биспецифические антитела действуют синергетически с анти-PD-1 антителами для повышения противоопухолевой эффективности *in vivo***

[0234] Аналогичные результаты были получены во втором эксперименте, идентичном тому, который обсуждался выше в Примере 20, за исключением того, что количество мышей в группе=10, а более высокая доза BCMAxCD3 REGN5458 составляла 0,4 мг/кг. Конкретные группы лечения для второго эксперимента показаны в Таблице 34 ниже.

**Таблица 34: Группы лечения**

Группа	Биспецифическое лечение	Антитело	n
1	H4SH17664D (0,4 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	10
2	H4SH17664D (0,4 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	10
3	REGN5458 (0,04 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	10
4	REGN5458 (0,04 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	10
5	REGN5458 (0,4 мг/кг)	Изотип (4 мг/кг)	10
6	REGN5458 (0,4 мг/кг)	RPM1-14 (4 мг/кг)	10

[0235] Результаты демонстрируют, что комбинация REGN5458 плюс блокада PD-1 обеспечивает лучшую противоопухолевую эффективность, чем REGN5458 или блокада PD-1 по отдельности. В частности, результаты демонстрируют, что в День 21 (последний день, для которого собирали данные для всех групп лечения) комбинация BCMAxCD3 биспецифического антитела и анти-PD-1 антитела оказывала синергетический терапевтический эффект в отношении ингибирования опухолевого роста (Таблица 35, BCMAxCD3 в дозе 0,04 мг/кг и анти-PD-1 в дозе 4 мг/кг). Используя двухфакторный дисперсионный анализ в День 21,  $p < 0,0001$  между (i) REGN5458 (0,04 мг/кг) + изотип и комбинацией REGN5458 (0,04 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 3 в сравнение с

группой 4), (ii) анти-PD-1 и комбинацией REGN5458 (0,04 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 2 по сравнению с группой 4), (iii) анти-PD-1 и комбинацией REGN5458 (0,4 мг/кг) + анти-PD-1 антитело (группа 2 по сравнению с группой 6). Как обсуждалось выше в Примере 20, увеличение дозы ВСМАхCD3 биспецифического антитела (0,4 мг/кг) в комбинации с блокадой PD-1 приводило к ингибированию опухоли, сравнимому с более низкой дозой биспецифического антитела в комбинации с блокадой PD-1 в данном эксперименте. Продемонстрированный синергизм с более низкой дозой биспецифического антитела является преимуществом, поскольку использование более низкой дозы снижает риск любых неблагоприятных побочных эффектов. Сходным образом, комбинация ВСМАхCD3 биспецифического антитела и анти-PD-1 антитела показывала синергетический терапевтический эффект при обеих дозах биспецифического антитела (0,04 мг/кг и 0,4 мг/кг) в группе мышей без опухолей в конце эксперимента (День 25), как показано в Таблице 36.

**Таблица 35: Средний размер опухоли в различные моменты времени**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 3</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	9,85 ± 0,61 n=10
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	13,44 ± 1,44 n=10
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	12,41 ± 2,56 n=10
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	9,73 ± 1,25 n=10
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	11,22 ± 0,68 n=10
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	9,59 ± 1,78 n=10
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 6</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	40,43 ± 4,07 n=10
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	44,52 ± 2,80 n=10
ВСМАхCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	38,79 ± 3,52 n=10

BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	36,42 ± 3,51 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	16,11 ± 1,27 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	24,34 ± 1,86 n=10
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 10</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	149,41 ± 17,08 n=10
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	107,34 ± 13,73 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	116,32 ± 19,99 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	23,48 ± 3,24 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	24,27 ± 6,74 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	3,60 ± 1,92 n=10
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 13</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	386,55 ± 48,49 n=10
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	186,87 ± 41,06 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	319,91 ± 53,05 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	10,60 ± 2,34 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	50,93 ± 20,00 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	0,74 ± 0,74 n=10

<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 18</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1809,29 ± 242,64 n=9
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	688,52 ± 152,20 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	1314,27 ± 211,22 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	6,28 ± 4,55 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	248,51 ± 107,21 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	3,93 ± 2,67 n=10
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 21</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	3094,87 ± 482,38 n=8
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	1425,22 ± 338,49 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	2446,35 ± 395,48 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	15,03 ± 10,35 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	453,43 ± 174,75 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	9,34 ± 7,59 n=10
<b>Обработка антителом</b>	<b>Средний размер опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС в День 25</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	Животные умерщвлены n=0
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	1918,27 ± 571,19 n=6

BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	2411,64 ± 451,96 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	38,96 ± 21,47 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	661,70 ± 331,60 n=8
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	32,02 ± 24,67 n=10

**Таблица 36: Мыши без опухолей в конце эксперимента**

<b>Обработка антителом</b>	<b>Количество мышей без опухолей в конце эксперимента (День 25)</b>
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	0 из 10
CD3-связывающий контроль H4SH17664D (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	1 из 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	0 из 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	7 из 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + Изотип (4 мг/кг)	2 из 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 мг/кг) + PD-1-блокирующее RPM1-14 (4 мг/кг)	8 из 10

**[0236]** Данное изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации подпадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:
  - (a) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген созревания В-лимфоцитов (BCMA) человека на целевой опухолевой клетке с  $EC_{50}$  меньше чем около 100 нМ, как измерено с помощью *in vitro* анализа связывания FACS; и
  - (b) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-6}$  М, как измерено с помощью *in vitro* анализа связывания FACS.
2. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула активирует Т-лимфоциты *in vitro* с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-9}$  М.
3. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула опосредует *in vitro* уничтожение Т-лимфоцитами линий опухолевых клеток, экспрессирующих BCMA с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-9}$  М.
4. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула опосредует *in vitro* уничтожение аутологичными Т-лимфоцитами первичных миеломных клеток, экспрессирующих BCMA, с  $EC_{50}$  меньше чем около  $10^{-8}$  М.
5. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-4, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула взаимодействует с аминокислотными остатками с 1 по 43 BCMA, как указано в SEQ ID NO: 106.
6. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-5, где целевая опухолевая клетка представляет собой плазматическую клетку.
7. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-6, где целевая опухолевая клетка принадлежит пациенту, страдающему от множественной миеломы или другого В-лимфоцитарного нарушения, которое частично характеризуется наличием В-лимфоцитов, экспрессирующих BCMA.
8. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-7, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула перекрестно реагирует с BCMA яванского макака.
9. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-8, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула не вступает в перекрестную реакцию с BCMA яванского макака.
10. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-9, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, экспрессирующих BCMA, в дозе от около 0,04 мг/кг до около 4,0 мг/кг.
11. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-10, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию

опухолевых клеток ВСМА+, выбранных из группы, состоящей из клеток миеломы, клеток лимфомы и клеток лейкемии.

12. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-11, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует пролиферацию опухолевых клеток ВСМА+, выбранных из группы, состоящей из клеток H929, клеток MOLP-8 и клеток OPM.

13. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-12, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и

(б) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

14. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 13, содержащая HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

15. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 13 или 14, содержащая LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

16. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 13, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

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

(а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 98; и

(б) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

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

(а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 100;

(б) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102; и

(c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

19. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 17 или 18, где второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

20. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 19, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

(a) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96; и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; или

(b) домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104; и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88.

21. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 20, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

(a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; или

(b) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

22. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 92, 94, 96, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88.

23. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68, 70, 72, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100, 102, 104, и домены LCDR1, LCDR2, LCDR3, соответственно, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 84, 86, 88.

24. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 22, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

25. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 23, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

26. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ВСМА человека, и содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 122 и 124, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 82, 123 и 125; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека.

27. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 26, где первый антигенсвязывающий домен содержит CDR из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82.

28. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 27, где первый антигенсвязывающий домен содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64, 68-70-72-76-78-80, 4-6-8-84-86-88, 20-22-24-84-86-88, 36-38-40-84-86-88, 52-54-56-84-86-88 и 68-70-72-84-86-88.

29. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 28, где первый антигенсвязывающий домен содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 122/123, 124/125, 2/82, 18/82, 34/82, 50/82, 66/82, 122/82 и 124/82.

30. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 26-29, где второй антигенсвязывающий домен содержит CDR пары аминокислотных

последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90/82 и 98/82.

31. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с ВСМА или связывается с тем же эпитопом на ВСМА, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 90/82 или SEQ ID NO: 98/82.

32. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с CD3 человека, или связывается с тем же эпитопом на CD3 человека, что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66/82, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 90/82 или SEQ ID NO: 98/82.

33. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-32, которая представляет собой биспецифическое антитело.

34. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 33, где биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека.

35. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 34, где константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG1.

36. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 34, где константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG4.

37. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 33-36, где биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который снижает связывание рецептора Fc $\gamma$  по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-37, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

39. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-37.

40. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 39.

41. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 40.

42. Способ ингибирования роста опухоли из плазматических клеток у субъекта, включающий в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-37, или фармацевтической композиции по п. 38.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что опухоль из плазматических клеток

представляет собой множественную миелому.

44. Способ по п. 42 ил 43, дополнительно включающий в себя введение второго терапевтического агента, или схему лечения.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что второй терапевтический агент или схема лечения включает в себя: химиотерапевтическое лекарственное средство, ДНК-алкиляторы, иммуномодуляторы, ингибиторы протеасом, ингибиторы гистондеацетилазы, лучевую терапию, трансплантат стволовых клеток, отличающееся биспецифическое антитело, которое взаимодействует с отличающимся антигеном поверхности опухолевой клетки и Т-лимфоцитом или антигеном иммунной клетки, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки PD-1, PD-L1 или CTLA-4, или их комбинацию.

46. Способ лечения пациента, страдающего от множественной миеломы или другого злокачественного новообразования из ВСМА-экспрессирующего В-лимфоцита, включающий в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-37, или фармацевтической композиции по п. 38.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что злокачественное новообразование из ВСМА-экспрессирующего В-лимфоцита, выбирают из группы, состоящей из: макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы маргинальной зоны, лимфоплазмочитарной лимфомы и лимфомы Ходжкина.

48. Способ по п. 46 или 47, дополнительно включающий в себя введение второго терапевтического агента.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что второй терапевтический агент или схема лечения включает в себя: химиотерапевтическое лекарственное средство, ДНК-алкиляторы, иммуномодуляторы, ингибиторы протеасом, ингибиторы гистондеацетилазы, лучевую терапию, трансплантат стволовых клеток, отличающееся биспецифическое антитело, которое взаимодействует с отличающимся антигеном поверхности опухолевой клетки и Т-лимфоцитом или антигеном иммунной клетки, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки PD-1, PD-L1 или CTLA-4, или их комбинацию.

50. Способ лечения пациента, страдающего от опухоли, экспрессирующей ВСМА, включающий в себя введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-37, или фармацевтической композиции по п. 38, в комбинации с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело или

антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-PD-1 антитело.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело представляет собой цемиплимаб (REGN2810).

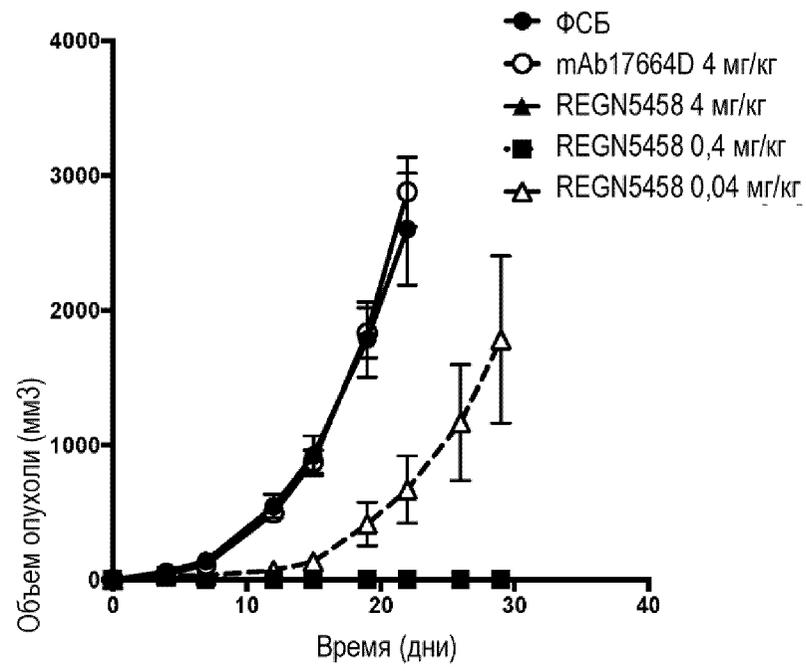
53. Применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-37, или фармацевтической композиции по п. 38, при лечении заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА.

54. Применение по п. 53, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

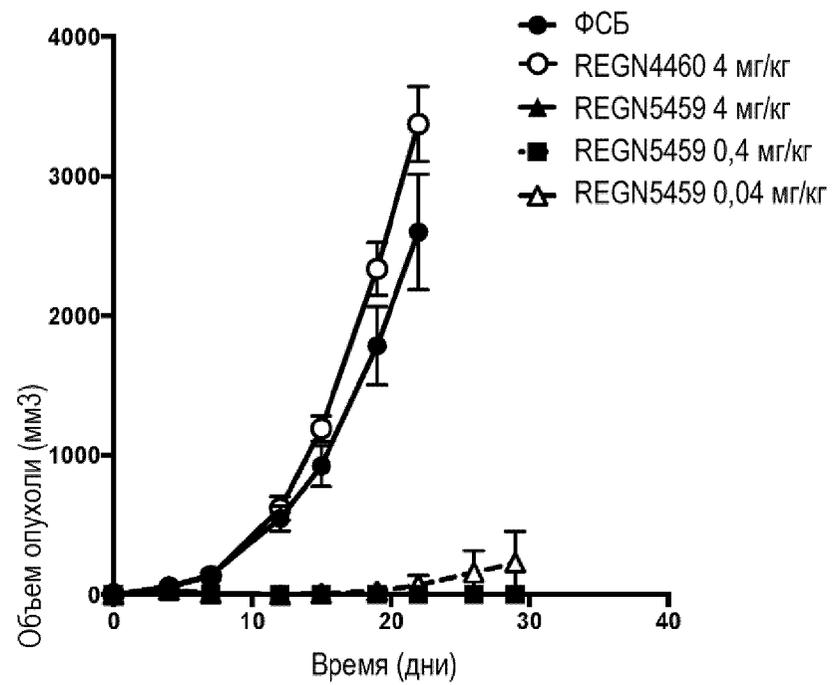
55. Применение по п. 54, где рак представляет собой множественную миелому.

56. Применение по любому из пп. 53-55, где антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинации с анти-PD-1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

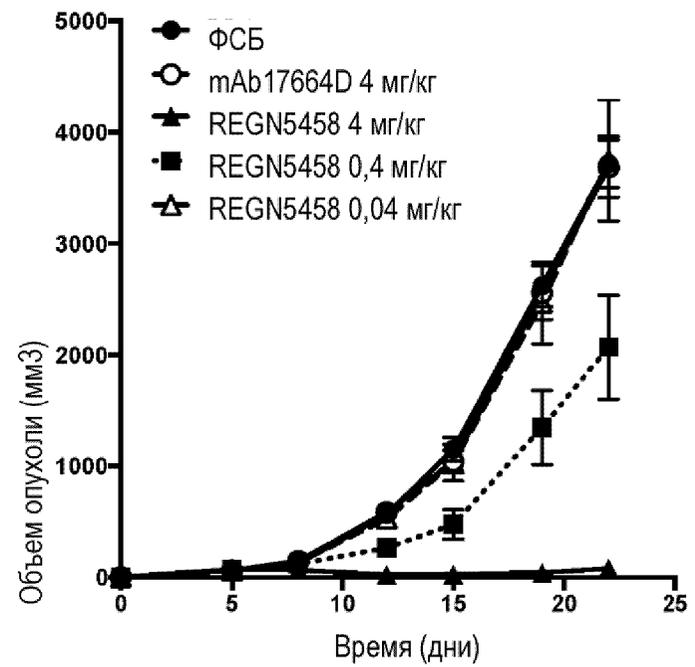
По доверенности



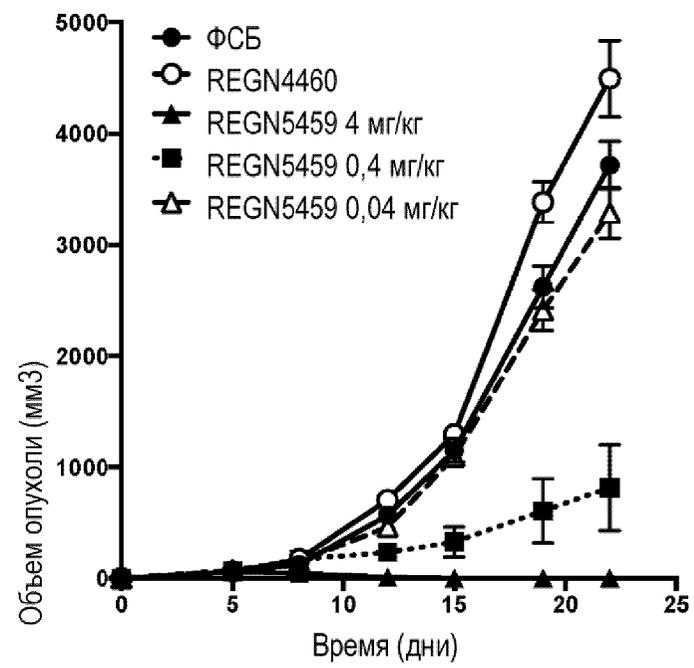
Фиг. 1



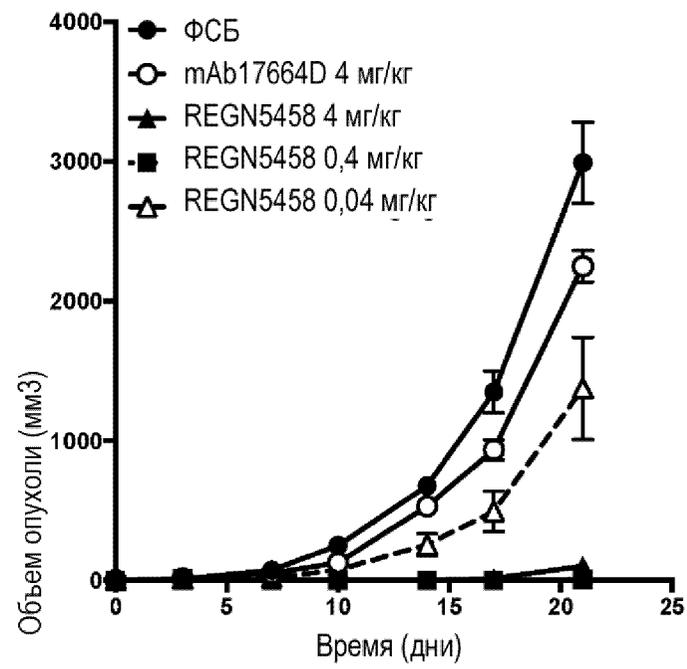
Фиг. 2



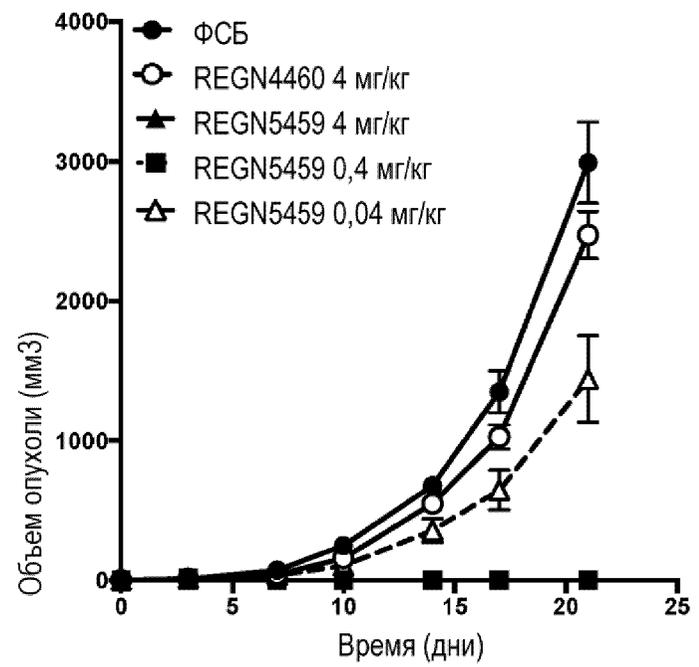
Фиг. 3



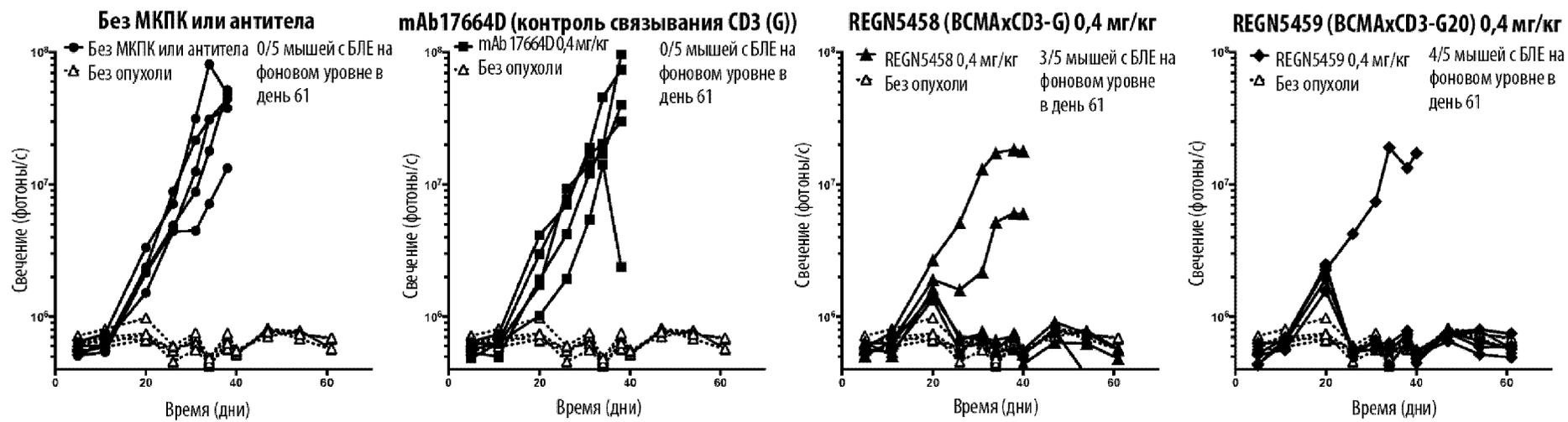
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7