

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191580** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2021.11.01(22) Дата подачи заявки
2019.12.18(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)(54) **БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-CD28 X АНТИ-CD22 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/781,689

(32) 2018.12.19

(33) US

(86) PCT/US2019/067173

(87) WO 2020/132066 2020.06.25

(71) Заявитель:

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

(72) Изобретатель:

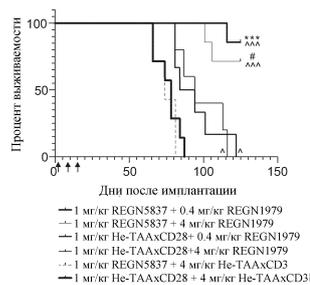
Мерфи Эндрю Дж., Скокос Димитрис,**Уэйт Джейнелл, Уллман Эрика,****Херманн Айнур, Смит Эрик,****Олсон Кара, Вей Джойс, Янкопулос****Джордж Д. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает человеческий CD28, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает человеческий CD22. В некоторых вариантах воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих CD22, таких как В-клеточные лимфомы. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению являются подходящими для лечения заболеваний и расстройств, при которых желателен и/или терапевтически эффективен усиленный или индуцированный направленный иммунный ответ.

Лечение мышей NSG, несущих опухоли WSU-DLCL2, с помощью REGN5837 в присутствии субэффективных доз REGN1979 связано со значительно большей выживаемостью по сравнению с монотерапией REGN5837 или REGN1979

**A1****202191580****202191580****A1**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569056EA/019

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-CD28 X АНТИ-CD22 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке испрашивается приоритет относительно предварительной заявки США № 62/781689, поданной 19 декабря 2018 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 16 декабря 2019 г., называется 118003_49220_SL.txt и имеет размер 104 353 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD28 и целевую молекулу, такую как CD22, и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ изобретения

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

[0005] Антитела против CD28 были предложены для терапевтических целей, включающих активацию Т-клеток. Одно определенное антитело против CD28, TGN1412 (суперагонист против CD28), было использовано в клиническом испытании в 2006 году. Шести здоровым добровольцам внутривенно вводили TGN1412 (суперагонист анти-CD28) в дозе 0,1 мг/кг. В течение двух часов у всех шести пациентов наблюдались выраженные воспалительные реакции (цитокиновый шторм), и у всех пациентов наблюдалась полиорганная недостаточность в течение шестнадцати часов. Индивидов лечили кортикостероидами, и уровни цитокинов вернулись к нормальным уровням в течение 2-3 дней. Начальная доза 0,1 мг/кг в исследовании фазы I (связанное с СВК) была основана на 500-кратной максимальной недействующей дозы (МНД) яванского макака, составляющей 50 мг/кг (Suntharalingam, *et al.*, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal

Antibody TGN1412, *NEJM* 355:1018-1028 (2006)). К сожалению, TGN1412 вызвал цитокиновый шторм, который не был предсказан токсикологическими исследованиями на яванских макаках или исследованиями *ex vivo* на мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) человека.

[0006] CD22 (также известный как Siglec-2), член семейства Siglec, специфично распознает α 2,6 сиаловую кислоту и представляет собой трансмембранный белок, предпочтительно экспрессируемый на В-лимфоцитах (В-клетках).

[0007] CD22 имеет ряд приписываемых ему функций, включая, например, гомеостаз В-клеток, выживание и миграцию В-клеток, подавление передачи сигналов TLR и CD40 и ингибирование передачи сигналов рецептора В-клеток (BCR) посредством рекрутирования фосфатаз, содержащих домен SH2, путем фосфорилирования иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIM) в цитоплазматической области, а также облегчение адгезии между В-клетками и другими типами клеток.

[0008] CD22 не обнаруживается на поверхности В-клеток на ранних стадиях развития и не экспрессируется в стволовых клетках. Однако 60-70% всех В-клеточных лимфом и лейкозов экспрессируют CD22.

[0009] Было исследовано антитело против CD22 для лечения В-клеточных лимфом и лейкозов. Однако моноклональное антитело эспратузумаб имело ограниченный успех. (Grant, *et al.* (2013) *Cancer* 119(21): 10.1002/cncr.28299)

[0010] Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных анти-CD22-антителах. Также существует потребность в антителе к CD28, которое безопасно для использования в фармацевтической композиции. Кроме того, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как CD28, так и целевой антиген (такой как CD22), могут быть полезны в терапевтических условиях, в которых желательно специфичное нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих целевой антиген.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В первом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD28 и антиген-мишень. Согласно некоторым примерным вариантам воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы связывают CD28 и CD22; такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также называются в данном документе «биспецифичными молекулами анти-CD28/анти-CD22». Анти-CD22-часть биспецифичной молекулы анти-CD28/анти-CD22 полезна для нацеливания на раковые клетки, которые экспрессируют CD22 (например, злокачественные В-клетки), а анти-CD28-часть биспецифичной молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание CD22 с раковой клеткой и CD28 с Т-клеткой способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) целевой раковой клетки активированной Т-клеткой, например, после активации TCR Т-клетки. Следовательно, биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению полезны, среди прочего, для лечения заболеваний и расстройств, связанных с опухолями или вызванных опухолями,

экспрессирующими CD22 (например, нарушение пролиферации В-клеток, например, В-клеточная лимфома, например, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL, фолликулярная лимфома (FL), лимфома маргинальной зоны).

[0012] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно этому аспекту настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает человеческий CD28, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22. Настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22 (например, биспецифичные антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с переменной областью легкой цепи (LCVR). В некоторых примерных вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающий домен анти-CD28 и антигенсвязывающий домен анти-CD22 каждый содержат разные, отдельные HCVR в паре с общим LCVR.

[0013] Настоящее изобретение предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в таблице 6. Первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, как указано в таблице 6. Согласно некоторым вариантам воплощения первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 6. Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, как указано в таблице 6, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в таблице 6.

[0014] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:28 и 26 или по существу аналогичную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0015] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0016] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:28/10 и 26/10.

[0017] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0018] В некоторых вариантах воплощения изобретения первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 с SEQ ID NO:32/16.

[0019] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, включает домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO.: 28 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0020] Некоторые неограничивающие примеры биспецифичных антигенсвязывающих молекул анти-CD28/анти-CD22 по изобретению включают первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, имеющий, соответственно, аминокислотную последовательность: SEQ ID NO:28-30-32-12-14-16.

[0021] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает

CD22, включает переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2 и 18 или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0022] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, включает переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0023] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, включает пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2/10 и 18/10.

[0024] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные молекулы анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, включает домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8 и 24 или по существу аналогичную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0025] В некоторых вариантах воплощения изобретения второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8/16 и 24/16.

[0026] Настоящее изобретение также предоставляет биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, включает домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 20, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6 и 22, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1),

имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[0027] Некоторые неограничивающие примеры биспецифичных антигенсвязывающих молекул анти-CD28/анти-CD22 по изобретению включают второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, имеющий, соответственно, аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16 и 20-22-24-12-14-16.

[0028] В родственном варианте воплощения изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, где второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22, включает CDR-домены тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в вариабельной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:2/10 и 18/10.

[0029] В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR описанных в данном документе биспецифичных антигенсвязывающих молекул анти-CD28/анти-CD22, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотидные последовательности, приведенные в таблице 7 данного документа, а также молекулы нуклеиновых кислот, содержащие две или более полинуклеотидные последовательности, указанные в таблице 7, в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, также охватываются настоящим изобретением, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих производить антитела и извлекать произведенные антитела.

[0030] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, в которых любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают CD28, скомбинирован, соединен или иным образом связан с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают CD22 с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD28 и CD22.

[0031] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых применениях может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитела, лишённого фрагмента

фукозы, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для повышения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield *et al.* (2002) *JBC* 277:26733). В других применениях модификация галактозилирования может быть сделана с тем, чтобы изменить комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

[0032] В другом аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую представленную в данном документе биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-CD22 и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение предоставляет композицию, которая представляет собой комбинацию биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 и второго терапевтического агента. В одном варианте воплощения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируется с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой анти-CD28/анти-CD22. Примеры агентов, которые можно выгодно комбинировать с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой анти-CD28/анти-CD22, подробно обсуждаются в другом месте в настоящем документе.

[0033] В еще одном аспекте изобретение предоставляет терапевтические способы нацеливания/уничтожения раковых клеток, экспрессирующих CD22, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-CD22 по изобретению, индивиду, нуждающемуся в этом.

[0034] Настоящее изобретение также включает применение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией CD22 или вызванного ею.

[0035] В еще одном аспекте изобретение предоставляет терапевтические способы нацеливания/уничтожения раковых клеток, экспрессирующих CD22, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению, где биспецифичная антигенсвязывающая молекула анти-CD28/анти-CD22 комбинируется с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (например, анти-CD28/анти-CD22 в сочетании с антителами анти-CD3/анти-CD20).

[0036] В еще одном аспекте изобретение предоставляет терапевтические способы нацеливания/уничтожения раковых клеток, экспрессирующих CD22, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению, где биспецифичная антигенсвязывающая молекула анти-CD28/анти-CD22 комбинируется с ингибитором контрольной точки, нацеленным на PD-1, PD-L1 или CTLA-4 (например, анти-CD28/анти-CD-22 в сочетании с антителами против PD-1). Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения антитела к CD28/CD22 по настоящему изобретению

можно комбинировать с агентами, нацеленными на PD-1, такими как пембролизумаб (Keytruda®), ниволумаб (Opdivo®) или цемиплимаб (Libtayo®). В некоторых вариантах воплощения изобретения антитела анти-CD28/анти-CD22 по изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на PD-L1, такими как атезолизумаб (Tecentriq®), Авелумаб (Bavencio®) или Дурвалумаб (Imfinzi®). В некоторых вариантах воплощения изобретения антитела анти-CD28/анти-CD22 по изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на CTLA-4, такими как ипилимумаб (Yervoy®).

[0037] В еще одном аспекте изобретение предоставляет терапевтические способы нацеливания/уничтожения раковых клеток, экспрессирующих CD22, с использованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 по изобретению, где биспецифичная антигенсвязывающая молекула анти-CD28/анти-CD22 комбинируется с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (например, анти-CD28/анти-CD22 в сочетании с биспецифичными антителами анти-CD3/анти-CD20, например, REGN1979 (см. Патент США 9657102), где плечо анти-CD20 содержит аминокислотную пару HCVR/LCVR SEQ ID NO:1242/1258, а плечо анти-CD3 содержит аминокислотную пару SEQ ID NO:1250/1258)) и/или ингибитор контрольной точки, нацеленный на PD-1, PD-L1 или CTLA-4 (например, анти-CD28/анти-CD22 в сочетании с антителами против PD-1). Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения антитела к CD28/CD22 по настоящему изобретению могут быть объединены с агентами, нацеленными на PD-1, такими как пембролизумаб (Keytruda®), ниволумаб (Opdivo®) или цемиплимаб (Libtayo®), см., например, Патент США 9 987 500, где цемиплимаб содержит пару аминокислот HCVR/LCVR SEQ ID NO:162/170)). В некоторых вариантах воплощения антитела анти-CD28/анти-CD22 по изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на PD-L1, такими как атезолизумаб (Tecentriq®), авелумаб (Bavencio®) или дурвалумаб (Imfinzi®). В некоторых вариантах воплощения антитела анти-CD28/анти-CD22 по изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на CTLA-4, такими как ипилимумаб (Yervoy®).

[0038] Другие варианты воплощения станут очевидными из рассмотрения последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0039] **Фигура 1** представляет собой набор графиков, изображающих связывание биспецифичных антител анти-CD28/анти-CD22 с человеческими Т-клетками CD4+, экспрессирующими CD28, и клетками-мишенями, экспрессирующими человеческий CD22 на поверхности клеток.

[0040] **Фигуры 2А и 2В** представляют собой набор графиков, показывающих, что биспецифичные антитела анти-CD28/анти-CD22 демонстрируют повышенную продукцию люциферазы в присутствии первичной стимуляции Т-клеток и экспрессии мишени CD22. **Фигура 2А** представляет собой набор графиков, изображающих активацию сконструированных репортерных Т-клеток, инкубированных совместно с НЕК293/hCD20,

HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками в дополнение к постоянной дозе 200 пМ REGN1945 (отрицательный изотипический контроль hIgG4), по оценке продукции люциферазы. **Фигура 2В** представляет собой набор графиков, изображающих активацию сконструированных репортерных Т-клеток, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками в дополнение к постоянной дозе 200 пМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3), по оценке продукции люциферазы.

[0041] **Фигуры 3А и 3В** представляют собой набор графиков, показывающих, что биспецифичные антитела анти-CD28/анти-CD22 увеличивают продукцию IL-2 в присутствии первичной стимуляции Т-клеток и экспрессии мишени CD22. Более конкретно, **Фигура 3А** представляет собой набор графиков, изображающих активацию Т-клеток CD4⁺, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками в присутствии постоянной дозы 2 нМ REGN1945 (изотипический контроль hIgG4), по оценке продукции IL-2. **Фигура 3В** представляет собой набор графиков, изображающих активацию Т-клеток CD4⁺, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками в присутствии постоянной дозы 2 нМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3), по оценке продукции IL-2.

[0042] **Фигура 4** представляет собой набор графиков, показывающих, что комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках, сконструированных для экспрессии PD-L1.

[0043] **Фигура 5А** представляет собой набор графиков, показывающих, что комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 в присутствии клеток NALM6, сконструированных для экспрессии PD-L1.

[0044] **Фигура 5В** представляет собой набор графиков, показывающих, что комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках RAJI, сконструированных для экспрессии PD-L1.

[0045] **Фигура 6** представляет собой график, показывающий, что лечение мышей NSG, несущих опухоли NALM-6-luc, с помощью REGN5837 в присутствии REGN1979 (анти-CD20 x анти-CD3) связано со значительным подавлением опухоли. Вкратце, мышам NSG (n=от 6 до 9 на группу) прививали человеческие МКПК, затем имплантировали клетки В-клеточного лейкоза NALM-6-luc через 12 дней после приживления (день 0). Мышам вводили 4 мг/кг REGN5837+0,04 мг/кг REGN1979 (заштрихованные кружки), 0,4 мг/кг REGN5837+0,04 мг/кг REGN1979 (закрашенные вертикальные треугольники), 0,04 мг/кг REGN5837+0,04 мг/кг REGN1979 (ромбы), 4 мг/кг не-ТААхCD28+0,04 мг/кг REGN1979 (квадраты), 4 мг/кг REGN5837+0,4 мг/кг не-ТААхCD3 (белые кружки) или 4 мг/кг не-ТААхCD28+0,4 мг/кг не-ТААхCD3 (закрашенные перевернутые треугольники) на 8, 15 и 22 дни после имплантации (стрелки). Рост опухоли контролировали с помощью биолюминесцентного изображения объема опухоли на 6, 10, 14, 17, 20 и 23 дни после

имплантации. Комбинированные данные выражены как среднее значение группы \pm SEM (стандартная ошибка среднего). Статистическую значимость определяли с использованием двустороннего дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Следующие символы использовались для обозначения статистически значимых различий относительно контроля не-ТААхCD28+не-ТААхCD3: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

[0046] **Фигуры 7А-7С** представляют собой графики, показывающие, что REGN1979 активировал и направил Т-клетки человека на уничтожение клеток Nalm6 дозозависимым образом. Более конкретно, **Фигура 7А** представляет собой график, изображающий процент выживаемости клеток Nalm6 в присутствии указанных антител. **Фигура 7В** представляет собой график, изображающий процент клеток CD8+, экспрессирующих CD25 (CD25+) в присутствии указанных антител. **Фигура 7С** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD25+ CD8+ по оценке с помощью разведения Violet CellTrace в присутствии указанных антител.

[0047] **Фигуры 8А, 8В и 8С** представляют собой графики, показывающие, что REGN1979 активировал и направил Т-клетки человека на уничтожение клеток WSU-DLCL2 дозозависимым образом. Более конкретно, **Фигура 8А** представляет собой график, изображающий процент выживаемости клеток WSU-DLCL2 в присутствии указанных антител. **Фигура 8В** представляет собой график, изображающий процент клеток CD8+, экспрессирующих CD25 (CD25+) в присутствии указанных антител. **Фигура 8С** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD8+, выраженную в % разделенных клеток в присутствии указанных антител.

[0048] **Фигура 9** представляет собой набор графиков, показывающих, что в анализах с человеческими МКПК и клетками WSU-DLCL2 REGN1979 индуцировал высвобождение человеческих цитокинов, IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10. Высвобождение цитокинов, наблюдаемое с REGN1979, увеличивалось в присутствии фиксированной концентрации CD22 X CD28 по сравнению с высвобождением цитокинов, индуцированным одним только REGN1979.

[0049] **Фигуры 10А-10Е** представляют собой графики, показывающие, что REGN1979 активировал и направлял человеческие Т-клетки на истощение клеток НХЛ (неходжсинская лимфома) дозозависимым образом. Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало цитотоксическую эффективность (EC50) REGN1979 в 2,3 и 3,5 раза по сравнению с REGN1979 с контрольным антителом CD28 с одним плечом или без костимулирующего контроля. Наблюдаемый лизис клеток-мишеней, опосредованный REGN1979, был связан с активацией и пролиферацией Т-клеток, что измерялось по стимулирующему действию CD25, соответственно, на клетки CD8+ и CD4+ или по разведению Violet Cell Trace. Более конкретно, **Фигура 10А** представляет собой график, изображающий процент выживаемости клеток НХЛ из костного мозга пациента в присутствии указанных антител. **Фигура 10В** представляет собой график, изображающий процент клеток CD8+, экспрессирующих CD25 (CD25+) в присутствии указанных антител. **Фигура 10С** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD8+ по оценке с

помощью разведения Violet CellTrace в присутствии указанных антител. **Фигура 10D** представляет собой график, изображающий процент клеток CD4⁺, экспрессирующих CD25 (CD25⁺) в присутствии указанных антител. **Фигура 10E** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD4⁺ по оценке с помощью разведения Violet CellTrace в присутствии указанных антител.

[0050] **Фигуры 11A-11E** представляют собой графики, показывающие, что REGN5837 увеличивает эффективность опосредованной REGN1979 цитотоксичности, экспрессию CD25 на клеточной поверхности и пролиферацию Т-клеток зависимым от концентрации образом. Вкратце, клетки WSU-DLCL2 инкубировали с обогащенными лимфоцитами МКПК человека при соотношении клеток-мишеней к МКПК 1 : 5 и с анти-CD20xCD3 (REGN1979) в диапазоне концентраций (от 4,8 фМ до 10 нМ) в качестве единственного агента (т.е. , без REGN5837) или в присутствии фиксированных концентраций REGN5837 (от 0,01 до 15 мкг/мл) в течение 72 часов при 37°C. Условие, в котором отсутствует REGN1979, содержит только REGN5837 в указанной концентрации, и на графике показано как 0,04 пМ. Жизнеспособные клетки были обнаружены с помощью проточной цитометрии с использованием окрашивания клеток LIVE/DEAD (**11A**). Для обнаружения активации Т-клеток (измеренной как экспрессия CD25; **11B**, **11D**) и пролиферации Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ с помощью проточной цитометрии (**11C**, **11E**) использовали краситель Violet Cell Tracker и фенотипический коктейль из меченных флуорофором антител к CD2, CD4, CD8 и CD25.

[0051] Более конкретно, **Фигура 11A** представляет собой график, изображающий % мертвых клеток с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 11B** представляет собой график, изображающий процент клеток CD25⁺ CD4⁺ с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 11C** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD4⁺ по оценке с помощью разведения Violet CellTrace с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 11D** представляет собой график, показывающий процент клеток CD25⁺ CD8⁺. **Фигура 11E** представляет собой график, изображающий пролиферацию клеток CD8⁺ по оценке с помощью разведения Violet CellTrace с указанными концентрациями REGN5837.

[0052] **Фигуры 12A-12G** представляют собой графики, показывающие, что REGN5837 увеличивает эффективность и максимальные уровни опосредованного REGN1979 высвобождения цитокинов из Т-клеток человека зависимым от концентрации образом в присутствии клеток В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2. Вкратце, клетки WSU-DLCL2 инкубировали с обогащенными лимфоцитами МКПК человека при соотношении клеток-мишеней к МКПК 1 : 5 и с анти-CD20xCD3 (REGN1979) в диапазоне концентраций (от 4,8 фМ до 10 нМ) в качестве единственного агента (т.е. , без REGN5837) или в присутствии фиксированных концентраций REGN5837 (от 0,01 до 15 мкг/мл) в течение 72 часов при 37°C. Условие, в котором отсутствует REGN1979, содержит только REGN5837 в указанной концентрации и на графике показано как 0,04 пМ. Супернатанты оценивали на предмет высвобождения цитокинов (**12A**) IL-2, (**12B**) IL-4, (**12C**) IL-6, (**12D**) IL-10, (**12E**)

TNF- α , (12F) IFN- γ и (12G) IL-17 α , используя набор BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.

[0053] Более конкретно, **Фигура 12А** представляет собой график, изображающий уровень IL-2, высвобожденного из Т-клеток человека в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12В** представляет собой график, изображающий уровень IL-4, высвобождаемого из Т-клеток человека в присутствии клеток WSU-DLCL2, клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12С** представляет собой график, изображающий уровень IL-6, высвобожденного из Т-клеток человека в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12D** представляет собой график, изображающий уровень IL-10, высвобождаемого из Т-клеток человека в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12Е** представляет собой график, изображающий уровень TNF- α , высвобожденного из человеческих Т-клеток в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12F** представляет собой график, изображающий уровень IFN- γ , высвобождаемый из человеческих Т-клеток в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837. **Фигура 12G** представляет собой график, изображающий уровень IL-17 α , высвобожденного из Т-клеток человека в присутствии клеток WSU-DLCL2 с указанными концентрациями REGN5837.

[0054] **Фигуры 13А и 13В** представляют собой графики, показывающие, что лечение мышей NSG, несущих опухоли WSU-DLCL2, с помощью REGN5837 в присутствии 0,4 или 4 мг/кг REGN1979 связано со значительным подавлением опухоли. Вкратце, самкам мышей NSG (n=6-7 на группу) имплантировали смесь 1 : 1 клеток В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2 и МКПК человека (день 0). Мышам вводили комбинации 1 мг/кг REGN5837 и 0,4 мг/кг (**13А**) или 4 мг/кг (**13В**) REGN1979 (или неперекрывающиеся контроли) на 1, 8 и 15 дни после имплантации (стрелки). Рост опухоли контролировали путем измерения штангенциркулем на 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57 и 63 дни после имплантации. Комбинированные данные выражены как среднее значение по группе \pm SEM. Статистическую значимость определяли с использованием двустороннего дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Для обозначения статистически значимых различий между группами использовались следующие символы: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001. Звездочки указывают на статистическую значимость между монотерапией REGN1979 и изотипическим контролем, решетки указывают на значимость между комбинацией REGN5837 с REGN1979 и изотипическим контролем, а кружки указывают на значимость между монотерапией REGN1979 и комбинацией REGN5837 с REGN1979.

[0055] Более конкретно, **Фигура 13А** представляет собой график, изображающий рост опухоли у мышей, которым вводили 1 мг/кг REGN5837 и 0,4 мг/кг REGN1979 (или не перекрывающиеся контроли, не-ТААхCD3). **Фигура 13В** представляет собой график, изображающий рост опухоли у мышей, которым вводили 1 мг/кг REGN5837 и 4 мг/кг REGN1979 (или не перекрывающиеся контроли, не-ТААхCD3).

[0056] **Фигура 14** представляет собой график, показывающий, что лечение мышей NSG, несущих опухоли WSU-DLCL2, с помощью REGN5837 в присутствии субэффективных доз REGN1979 связано со значительно большей выживаемостью по сравнению с монотерапией REGN5837 или REGN1979. Вкратце, самкам мышей NSG (n=от 6 до 7 на группу) имплантировали смесь 1 : 1 клеток В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2 и МКПК человека (день 0). Мышам вводили комбинации REGN5837 и REGN1979 или контроли на 1, 8 и 15 дни после имплантации (стрелки). Статистическая значимость определялась с помощью теста Мантеля-Кокса. Для обозначения статистически значимых различий между группами использовались следующие символы: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. Крестики обозначают статистическую значимость по сравнению с изотипическим контролем, звездочки обозначают значимость по сравнению с монотерапией REGN1979 0,4 мг/кг, а решетки обозначают значимость по сравнению с монотерапией REGN1979 в дозе 4 мг/кг.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0057] Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов воплощения и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения

[0058] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается обыкновенным специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение. Используемый в данном документе термин «приблизительно», когда он используется по отношению к конкретному приведенному числовому значению, означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, как используется здесь, выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[0059] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут использоваться на практике или при тестировании настоящего изобретения, в данном документе представлены предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения

[0060] Выражение «CD28», в контексте данного документа, относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в качестве костимулирующего рецептора. CD28 человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:74, и/или имеет аминокислотную последовательность, указанную в регистрационном номере NCBI NP_006130.1. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в данном

документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к видам, не относящимся к человеку. Таким образом, выражение «CD28» означает человеческий CD28, если не указано, что он принадлежит к нечеловеческому виду, например, «мышинный CD28», «обезьяний CD28» и т. д.

[0061] В контексте данного документа, «антитело, которое связывает CD28» или «антитело против CD28» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают мономерный CD28, а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают димерный CD28. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связывать растворимый CD28 и/или CD28, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый CD28 включает природные белки CD28, а также варианты рекомбинантных белков CD28, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD28, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом не связаны с клеточной мембраной.

[0062] В контексте данного документа, выражение «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» означает один или более белков CD28, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, таким образом, что по меньшей мере часть белка CD28 находится на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает белки CD28, содержащиеся в контексте функционального костимулирующего рецептора Т-клетки в мембране клетки. Выражение «CD28, экспрессируемый на поверхности клетки» включает белок CD28, экспрессируемый как часть гомодимера на поверхности клетки. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD28. Альтернативно, «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий CD28 на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD28 на своей поверхности.

[0063] В контексте данного документа, выражение «анти-CD28-антитело» включает как моновалентные антитела с единственной специфичностью, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD28, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, где плечо анти-CD28 включает любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 данного документа. Примеры биспецифичных антител против CD28 описаны в другом месте данного документа. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0064] Термин «CD22», в контексте данного документа, относится к белку CD22 человека, если не указано, что он принадлежит к нечеловеческому виду (например, «CD22 мыши», «CD22 обезьяны» и т. д.). Белок CD22 человека имеет аминокислотную

последовательность, указанную под регистрационным номером CAA42006. Последовательность рекомбинантного экто CD22 человека (D20-R687) с гексагистидиновой меткой мус мус («гексагистидин», описанный как SEQ ID NO:60) показана под номером доступа NP_001762.2, а также как SEQ ID NO:50. Эктодомен hCD22 (D20-R687).hFc, также можно приобрести от R&D Systems, Catalog# 1968-SL-050.

[0065] В контексте данного документа, термин «антитело, связывающее CD22» или «антитело против CD22» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут связывать растворимый CD22 и/или CD22, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый CD22 включает природные белки CD22, а также варианты рекомбинантных белков CD22, такие как, например, конструкции CD22, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом не связаны с клеточной мембраной.

[0066] В контексте данного документа, выражение «анти-CD22-антитело» включает как моновалентные антитела с единственной специфичностью, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD22, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, где плечо анти-CD22 включает любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 данного документа. Примеры биспецифичных антител против CD22 описаны в других разделах настоящего документа. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0067] Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0068] Термин «антитело», в контексте данного документа, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), который специфично связывается с конкретным антигеном (например, CD28) или взаимодействует с ним. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь включает переменную область легкой цепи (сокращенно LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемых каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах воплощения изобретения FR антитела против CD28 и/или антитела против CD22 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой

линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе совместных анализов двух или более CDR.

[0069] Термин «антитело», в контексте данного документа, также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., в контексте данного документа, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или созданный с помощью генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

[0070] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты F_d; (iv) фрагменты F_v; (v) одноцепочечные молекулы F_v (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенный определяющий комплементарный участок (CDR), такой как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т. д.), мелкомолекулярные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также охватываются, в контексте данного документа, выражением «антигенсвязывающий фрагмент».

[0071] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом с одной или более каркасными последовательностями или находится в рамке с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться 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 . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[0072] В некоторых вариантах воплощения 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 по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент может включать 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 более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

[0073] Как и в случае с полными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая иллюстративные форматы биспецифичного антитела, раскрытые в данном документе, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных методик, имеющихся в данной области техники.

[0074] Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). «Комплемент-зависимая цитотоксичность» (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом по изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая клеточная цитотоксичность» (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные киллерные (NK) клетки, нейтрофилы и макрофаги) узнают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с

применением хорошо известных анализов, имеющихся 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 основе того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

[0075] В некоторых вариантах воплощения изобретения антитела против CD28 и/или антитела против CD22 по настоящему изобретению (моноспецифичные или биспецифичные) являются человеческими антителами. Термин «человеческое антитело», в контексте данного документа, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «человеческое антитело», в контексте данного документа, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

[0076] Антитела по изобретению в некоторых вариантах воплощения могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Термин «рекомбинантное человеческое антитело», в контексте данного документа, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанной ниже), антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см, например, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах воплощения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используются животные, трансгенные по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из

последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и относятся к ним, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

[0077] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью межцепочечной тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

[0078] Частота появления второй формы в различных изотипах интактного IgG обусловлена, без ограничений, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Простая аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно снизить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, области CH2 или CH3, которые могут быть желательны, например, при получении, для повышения выхода желаемой формы антитела.

[0079] Антитела по изобретению могут быть выделенными антителами. «Выделенное антитело», в контексте данного документа, означает антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело существует или вырабатывается в природе, является «выделенным антителом» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, прошедшие по меньшей мере одну стадию очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам воплощения выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0080] Настоящее изобретение также включает одноплечевые антитела, которые связывают CD28 и/или CD22. В контексте данного документа, термин «одноплечевое антитело» означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела по настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1.

[0081] Антитела против CD28 и/или антитела против CD22, представленные в данном документе, или их антигенсвязывающие домены могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими

последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антигенсвязывающие белки или антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, имеющимися, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или участках CDR мутированы до соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе называются в совокупности, как «мутации зародышевой линии»). Обычный специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах воплощения все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. В других вариантах воплощения только некоторые 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 воплощения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено изначально). Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или участков CDR, например, где некоторые отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются из исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или видоизменяются до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т. д. Антитела

или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

[0082] Настоящее изобретение также включает антитела против CD28 и/или антитела против CD22 и антигенсвязывающие молекулы, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные варианты, включенные в этот аспект изобретения, включают варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD28 и антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 6 данного документа.

[0083] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфичным сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп является эпитопом, продуцируемым соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых обстоятельствах эпитоп может включать части сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[0084] Термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный», когда относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере приблизительно 95%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с референсной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый референсной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0085] Применительно к полипептидам термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за продолжение делеции по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, даже более предпочтительно

идентичность последовательности по меньшей мере 98 или 99%. Предпочтительно, чтобы неидентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См, например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0086] Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя измерения сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См, например, GCG Version 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1, используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson

(2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от 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 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

[0087] Термины «нарушение пролиферации клеток» и «нарушение пролиферации» относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной пролиферации клеток, для которых может быть полезно лечение биспецифичными антигенсвязывающими молекулами анти-CD28/анти-CD22 или способом изобретения. Сюда входят хронические и острые расстройства, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому расстройству. В одном варианте воплощения нарушение пролиферации клеток представляет собой рак, физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток.

[0088] Термин «опухоль», в контексте данного документа, относится ко всем неопластическим клеткам роста и пролиферации, злокачественным или доброкачественным, и ко всем предраковым и злокачественным клеткам и тканям. Термины «рак», «злокачественный», «нарушение пролиферации клеток», «нарушение пролиферации» и «опухоль» не являются взаимоисключающими в контексте настоящего описания.

[0089] «Нарушение пролиферации В-клеток» включает лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (НХЛ), такую как агрессивная НХЛ, рецидивирующую агрессивную НХЛ, высокодифференцированную НХЛ/фолликулярную НХЛ, мелкоклеточную лимфоцитарную НХЛ (SL), НХЛ промежуточной степени злокачественности/фолликулярную НХЛ, НХЛ диффузную промежуточной степени злокачественности, высокодифференцированную иммунобластную НХЛ, высокодифференцированную лимфобластную НХЛ, высокодифференцированную мелкоклеточную НХЛ с нерассеченными ядрами, НХЛ с объемным заболеванием, вялотекущую НХЛ, включая рецидивирующую вялотекущую НХЛ и устойчивую к ритуксимабу вялотекущую НХЛ; рефрактерную НХЛ, рефрактерную вялотекущую НХЛ, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому, связанную со СПИДом, и макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь Ходжкина с преобладанием лимфоцитов (LPHD), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); лейкоз, включая острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; и другие гематологические злокачественные новообразования.

[0090] Термин «неходжкинская лимфома» или «НХЛ», в контексте данного документа, относится к раку лимфатической системы, отличному от лимфомы Ходжкина. Лимфомы Ходжкина обычно можно отличить от неходжкинских лимфом по наличию клеток Рида-Штернберга в лимфомах Ходжкина и отсутствию указанных клеток в

неходжкинских лимфомах. Примеры неходжкинских лимфом, охватываемые этим термином, используемым в данном документе, включают любые лимфомы, которые могут быть идентифицированы как таковые специалистом в данной области техники (например, онкологом или патологом) в соответствии со схемами классификации, известными в данной области техники, такими как схема Revised European-American Lymphoma (REAL) как описано в Color Atlas of Clinical Hematology (3-е издание), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). См., в частности списки на ФИГ. 11.57, 11.58 и 11.59. Более конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, рецидивирующую или рефрактерную НХЛ, высокодифференцированную НХЛ первой линии, НХЛ стадии III/IV, резистентную к химиотерапии НХЛ, лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток и/или лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз и/или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, иммуноцитому и/или лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, экстранодальную лимфому маргинальной зоны - MALT, нодальную лимфому маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз, плазмоцитому и/или миелому плазматических клеток, высокодифференцированную лимфому из центра фолликулов/фолликулярную лимфому, лимфому промежуточной степени дифференцировки/фолликулярную НХЛ, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому фолликулярного центра (фолликулярная), диффузную НХЛ промежуточной степени дифференцировки, диффузную крупноклеточную В-лимфому, агрессивную НХЛ (включая агрессивную НХЛ первой линии и агрессивную рецидивирующую НХЛ), рецидивирующую НХЛ после трансплантации аутологичных стволовых клеток или резистентную к ней, первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, первичную эффузионную лимфому, высокодифференцированную иммунобластную НХЛ, высокодифференцированную лимфобластную НХЛ, высокодифференцированную мелкоклеточную НХЛ с нерассеченными ядрами, НХЛ с объемным заболеванием, лимфому Беркитта, лейкоз (периферический) из предшественников больших гранулярных лимфоцитов, грибовидный микоз и/или синдром Сезари, кожные лимфомы, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфангиому.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы

[0091] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Антитела против CD28 и/или антитела против CD22 по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его

фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй специфичностью связывания.

[0092] Использование в данном документе выражений «анти-CD28-антитело» и/или «анти-CD-22-антитело» предназначено для включения как моноспецифичных анти-CD28-антител, так и/или моноспецифичных анти-CD22-антител, а также биспецифичных антител, содержащих CD28-связывающее плечо или CD22-связывающее плечо и плечо, которое связывает целевой антиген. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий CD28 или CD22, а другое плечо иммуноглобулина специфично для целевого антигена. Антиген-мишень, с которым связывается другое плечо биспецифичного антитела CD28 или CD22, может быть любым антигеном, экспрессируемым на клетке, ткани, органе, микроорганизме или вирусе или вблизи них, против которых желателен целевой иммунный ответ. CD28-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 данного документа. CD22-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 данного документа. В некоторых вариантах воплощения CD28-связывающее плечо связывает человеческий CD28 и индуцирует пролиферацию человеческих Т-клеток.

[0093] В контексте биспецифичных антител по настоящему изобретению, где одно плечо антитела связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень, антиген-мишень может быть антигеном, ассоциированным с опухолью, таким как CD22.

[0094] Согласно некоторым примерным вариантам воплощения настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают CD28 и CD22. Такие молекулы могут называться здесь, например, «анти-CD28/анти-CD22», или «анти-CD28xCD22», или «CD28xCD22», или «анти-CD22/анти-CD28», или «анти-CD22xCD28», или биспецифичные молекулы «CD22xCD28», или « α CD22 x α CD28», или « α CD28 x α CD22», или может использоваться другая подобная терминология.

[0095] Согласно некоторым примерным вариантам воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичное антитело) могут иметь эффекторное плечо и нацеливающее плечо. Эффекторное плечо может быть первым антигенсвязывающим доменом (например, антитело анти-CD28), который связывается с антигенами на эффекторных клетках (например, Т-клетках). Нацеливающее плечо может представлять собой второй антигенсвязывающий домен (например, антитело анти-CD22), который связывается с антигенами на клетках-мишенях (например, опухолевых клетках). Согласно некоторым примерным вариантам воплощения эффекторное плечо связывается с CD28, а нацеливающее плечо связывается с CD22. Биспецифичной анти-CD28/CD22 может

обеспечивать костимулирующий сигнал эффекторным клеткам (например, Т-клеткам). Эффекторное плечо не влияет на стимуляцию Т-клеток без кластеризации. Одно только эффекторное плечо мало влияет на стимуляцию Т-клеток, если оно не используется в комбинации с нацеливающим плечом. Плечо, нацеленное на опухоль, может иметь несовершенную опухолевую специфичность. Антиген, который является мишенью нацеливающего плеча (например, CD22), может экспрессироваться на фракции опухолевых клеток. Специфичность плеча, нацеленного на опухоль, может быть увеличена путем наложения комбинации с биспецифичными антигенсвязывающими молекулами против CD3 (например, биспецифичным антителом против CD3/CD20).

[0096] В данном контексте выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одного определяющего комплементарность участка (CDR), который отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR), специфично связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах воплощения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определены в другом месте в настоящем документе.

[0097] В контексте данного документа, выражение «биспецифичная антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифичной антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфично связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфично связывает первый антиген (например, CD28), а второй антигенсвязывающий домен специфично связывает второй, отдельный антиген (например, CD22).

[0098] В некоторых примерных вариантах воплощения настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела включает переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифичное 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 называться в данном документе D1-HCDR1, D1-HCDR2 и D1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе D2-HCDR1, D2-HCDR2 и D2-HCDR3.

[0099] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или косвенно связаны друг с другом с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Альтернативно, первый

антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен каждый может быть связан с отдельным мультимеризующим доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифичную антигенсвязывающую молекулу. В контексте данного документа, термин «мультимеризующий домен» означает 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_H3 иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C_H2-C_H3), например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой группе изоформ.

[00100] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению обычно содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых индивидуально является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут иметь один и тот же изоформ IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2 и IgG4/IgG4. В качестве альтернативы, первый и второй мультимеризующие домены могут иметь разные изоформы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

[00101] В некоторых вариантах воплощения мультимеризующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах воплощения мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали.

[00102] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно использовать любой формат или технологию биспецифичных антител. Например, антитело или его фрагмент, обладающий первой специфичностью связывания антигена, может быть функционально связан (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющего вторую антигенсвязывающую специфичность, для получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифичные форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной переменный домен (OVO)-Ig, Quadroma, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадины и т. д.), CrossMab, CrossFab, (SEEO)тело, лейциновую

застежку-молнию, Oubody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (OAF)-IgG и биспецифичные форматы Mab² (для обзора вышеупомянутых форматов см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4: 6, 1-11 и цитируемые в данном документе ссылки).

[00103] В контексте биспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению мультимеризующие домены, например, домены Fc, могут содержать одно или более из аминокислотных изменений (например, вставки, делеции или замены) по сравнению с версией дикого типа домена Fc, встречающейся в природе. Например, изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в домене Fc, что приводит к модифицированному домену Fc, имеющему модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте воплощения биспецифичная антигенсвязывающая молекула включает модификацию в области C_H2 или C_H3, при этом модификация увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, LN/FIW или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/EID или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, UR/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или V); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте воплощения модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификации 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00104] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, где первый и второй домены Ig C_H3 отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере одно аминокислотное различие снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, не имеющим аминокислотного различия. В одном варианте воплощения первый домен Ig C_H3 связывает белок А, а второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание белка А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (от IMGT; Y436F от EU). Дополнительные модификации, которые можно найти во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

[00105] В некоторых вариантах воплощения домен Fc может быть химерным, объединяя последовательности Fc, полученные из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный домен Fc может включать часть или всю последовательность C_H2, полученную из области C_H2 человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Химерный домен Fc может также содержать химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать последовательность «верхнего шарнира», полученную из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью «нижнего шарнира», полученной из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, включает от N- до C-конца: [IgG4 C_H1] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG4 C_H3]. Другой пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, включает от N- до C-конца: [IgG1 C_H1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG1 C_H3]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в заявке WO2014/022540A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные устройства, и их варианты могут иметь измененное связывание рецептора Fc, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

Варианты последовательностей

[00106] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых произошли отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, имеющимися, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из примерных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR областях мутированы в соответствующие остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности

упоминаются в данном документе все вместе как «мутации зародышевой линии»). Обычный специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах воплощения все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой первоначально был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах воплощения только некоторые 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 воплощения один или более остатков каркасной области и/или CDR области мутированы до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или областей CDR, например, где некоторые отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или видоизменяются до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Настоящим изобретением охватываются биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом.

[00107] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим

аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00108] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе. Термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный», когда относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пробелов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, чтобы неидентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

[00109] Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами

по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См, например, GCG Version 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1., используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от 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 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

рН-зависимое связывание

[00110] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22 с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело к CD28 по настоящему изобретению может демонстрировать пониженное связывание с CD28 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Альтернативно, антитела к CD22 по изобретению могут проявлять повышенное связывание с CD22 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение «кислый рН» включает значения рН менее чем приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в данном документе выражение «нейтральный рН» означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный рН» включает значения рН приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[00111] В некоторых случаях «пониженное связывание ... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» выражается в терминах отношения значения K_D связывания антитела, с его антигеном при кислом рН, к значению K_D связывания антитела со своим антигеном при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как проявляющее «пониженное связывание с CD28 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет кислый/нейтральный коэффициент K_D приблизительно 3,0 или больше. В некоторых примерных вариантах воплощения кислотное/нейтральное отношение K_D для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

[00112] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на сниженное (или усиленное)

связывание с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

Антитела, содержащие варианты Fc

[00113] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящего изобретения предлагаются биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, содержащие домен Fc, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие молекулы, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, где мутация(и) увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в 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 воплощения модификация включает модификации 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификации 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00114] Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, содержащие домен Fc, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и других мутаций в переменных доменах антител, описанных в данном документе, рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и антигенсвязывающих молекул

[00115] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческие CD28 и/или CD22 с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD28 и/или CD22 со средней или низкой аффинностью,

в зависимости от терапевтического контекста и конкретных желаемых свойств нацеливания. Например, в контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень (например, CD22), может быть желательно, чтобы антигенсвязывающее плечо-мишень связывало антиген-мишень с высоким сродством, в то время как анти-CD28 плечо связывало CD28 только с умеренным или низким сродством. Таким образом может быть достигнуто предпочтительное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие целевой антиген, при одновременном предотвращении общего/нецелевого связывания CD28 и связанных с этим побочных эффектов, являющихся последствием.

[00116] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий CD22 (например, при 25°C) с K_D менее чем приблизительно 15 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD22 человека с K_D менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 14 нМ, менее чем приблизительно 13 нМ, менее чем приблизительно 12 нМ, менее чем приблизительно 11 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ или менее чем приблизительно 1 нМ, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь, или по существу аналогичного анализа.

[00117] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD22 обезьяны (например, при 25°C) с K_D менее чем приблизительно 60 мкМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD22 обезьяны с K_D менее чем приблизительно 60 мкМ, менее чем приблизительно 59 мкМ, менее чем приблизительно 58 мкМ, менее чем приблизительно 57 мкМ, менее чем приблизительно 56 мкМ, менее чем приблизительно 55 мкМ, менее чем приблизительно 54 мкМ, менее чем приблизительно 53 мкМ, менее чем приблизительно 52 мкМ, менее чем приблизительно 51 мкМ, менее чем приблизительно 50 мкМ, менее чем приблизительно 49 мкМ, менее чем приблизительно 48 мкМ, менее чем приблизительно 47 мкМ, менее чем приблизительно 46 мкМ, менее чем приблизительно 45 мкМ, менее чем приблизительно 44 мкМ, менее чем приблизительно 43 мкМ, менее чем приблизительно 42 мкМ, менее чем приблизительно 41 мкМ, менее чем приблизительно 40 мкМ, менее чем приблизительно 39

мкМ, менее чем приблизительно 38 мкМ, менее чем приблизительно 37 мкМ, менее чем приблизительно 36 мкМ, менее чем приблизительно 35 мкМ, менее чем приблизительно 34 мкМ, менее чем приблизительно 33 мкМ, менее чем приблизительно 32 мкМ, менее чем приблизительно 31 мкМ, менее чем приблизительно 30 мкМ, менее чем приблизительно 25 мкМ, менее чем приблизительно 20 мкМ, менее чем приблизительно 15 мкМ или менее чем приблизительно 10 мкМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа как определено в Примере 5 данного документа, или по существу аналогичного анализа.

[00118] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий CD28 (например, при 25° C) с K_D менее чем приблизительно 45 мкМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD28 человека с K_D менее чем приблизительно 45 мкМ, менее чем приблизительно 44 мкМ, менее чем приблизительно 43 мкМ, менее чем приблизительно 42 мкМ, менее чем приблизительно 41 мкМ, менее чем приблизительно 40 мкМ, менее чем приблизительно 39 мкМ, менее чем приблизительно 38 мкМ, менее чем приблизительно 37 мкМ, менее чем приблизительно 36 мкМ, менее чем приблизительно 35 мкМ, менее чем приблизительно 34 мкМ, менее чем приблизительно 33 мкМ, менее чем приблизительно 32 мкМ, менее чем приблизительно 31 мкМ, менее чем приблизительно 30 мкМ, менее чем приблизительно 25 мкМ, менее чем приблизительно 20 мкМ, менее чем приблизительно 15 мкМ, менее чем приблизительно 10 мкМ, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь, или по существу аналогичного анализа.

[00119] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD22 с диссоциативным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем приблизительно 7,5 минут, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 данного документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают человеческий CD22 с $t_{1/2}$ более чем приблизительно 7 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 15 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 25 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 35 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 45 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 55 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 65 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 75 минут или более чем приблизительно 100 минут, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в

Примере 5 здесь, или по существу аналогичного анализа.

[00120] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD22 обезьяны с диссоциативным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем приблизительно 4,3 минуты, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примерах данного документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD28 с $t_{1/2}$ более чем приблизительно 4 минут, более чем приблизительно 5 минут, более чем приблизительно 6 минут, более чем приблизительно 7 минут, более чем приблизительно 8 минут, более чем приблизительно 9 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 15 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 25 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 35 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 45 минут или более чем приблизительно 50 минут, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 здесь, или по существу аналогичного анализа.

[00121] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD28 с диссоциативным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем приблизительно 2,3 минуты, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 5 данного документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах воплощения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD28 с $t_{1/2}$ более чем приблизительно 2 минут, более чем приблизительно 5 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 200 минут, более чем приблизительно 300 минут, более чем приблизительно 400 минут, более чем приблизительно 500 минут, более чем приблизительно 600 минут, более чем приблизительно 700 минут, более чем приблизительно 800 минут, более чем приблизительно 900 минут, более чем приблизительно 1000 минут или более чем приблизительно 1200 минут, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примерах данного документа, или по существу аналогичного анализа.

[00122] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), которые способны связываться с CD28 человека и CD22 человека и обезьяны. Согласно некоторым вариантам воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению специфично взаимодействуют с клетками, экспрессирующими CD28 и/или CD22. Степень, в которой

биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD28 и/или CD22, может быть оценена с помощью сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS), как проиллюстрировано в Примере 6 данного документа. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают линии клеток человека или клетки яванского макака, которые экспрессируют CD28, но не CD22 (например, Т-клетки), и линии клеток человека или клетки яванского макака, которые экспрессируют CD22, но не CD28 (например, В-клетки или клетки Nalm6). Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любые из вышеупомянутых клеток и клеточных линий со значением EC_{50} от приблизительно $1,3 \times 10^{-6}$ до приблизительно $2,3 \times 10^{-8}$ М или менее, как определено с использованием анализа FACS, как изложено в Примере 6, или по существу аналогичного анализа.

[00123] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), которые способны связываться с человеческим CD28 и/или человеческим CD22. Согласно некоторым вариантам воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению специфично взаимодействуют с клетками, экспрессирующими CD28 и/или CD22. Степень, в которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD28 и/или CD22, можно оценить с помощью проточной цитометрии, как показано в примере 7 данного документа. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают человеческие клетки, которые экспрессируют CD28, но не CD22 (например, Т-клетки), и линии клеток человека, которые экспрессируют CD22, но не CD28 (например, клетки НЕК293, трансдуцированные человеческими CD22 и В-клетки Raji, генетически модифицированные для удаления CD80 и CD86). Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любые из вышеупомянутых клеток и клеточных линий со значением EC_{50} от приблизительно $1,14 \times 10^{-8}$ до приблизительно $9,76 \times 10^{-9}$ М или менее, как определено с помощью проточной цитометрии, как указано в Примере 7 или в по существу аналогичного анализа.

[00124] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам анти-CD28/анти-CD22, которые индуцируют или усиливают эффективность опосредованного CD20хCD3 уничтожения Т-клетками опухолевых клеток. Например, настоящее изобретение включает антитела против CD28хCD22, которые индуцируют или увеличивают эффективность опосредованного CD20хCD3 уничтожения Т-клетками опухолевых клеток с EC_{50} менее чем приблизительно $1,48 \times 10^{-10}$ М, как измерено в опухоли, опосредованной Т-клетками при анализе уничтожения клеток *in vitro*, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 8 данного документа (например, оценка степени уничтожения клеток Raji человеческими МКПК в присутствии антител против CD20хCD3 и против CD28хCD22) или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах воплощения антитела или

антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (например, опосредованное МКПК уничтожение клеток Raji) со значением EC_{50} менее чем приблизительно 150 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 75 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 25 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5,0 пМ, менее чем приблизительно 4,0 пМ, менее чем приблизительно 3,0 пМ, менее чем приблизительно 2,5 пМ, менее чем приблизительно 2,0 пМ или менее чем приблизительно 1,5 пМ, как измерено с помощью анализа уничтожения опухолевых клеток, опосредованного Т-клетками *in vitro*, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 8 данного документа, или по существу аналогичного анализа.

[00125] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, которые проявляют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: активации Т-клеток, индукции высвобождения IL-2, индукции повышающей регуляции CD25⁺ в человеческих МКПК; и повышения цитотоксичности, опосредованной человеческими Т-клетками, в отношении линий клеток, экспрессирующих CD22 (см., например, пример 9 в данном документе). Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, которые усиливают уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих CD22, в сочетании с биспецифичным антителом, связывающим CD20 и CD3, таким как, но не ограничиваясь этим, REGN1979. Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22, которые усиливают уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих CD22, в сочетании с антителом, связывающим PD-1, таким как, помимо прочего, цемиплимаб. (См. Примеры 10-15).

Картирование эпитопа и связанные технологии

[00126] Эпитоп на CD28 или CD22, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD28 или белка CD22. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD28 или CD22. Антитела по изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в мономере CD28, или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух разных цепях CD28 димера CD28. Термин «эпитоп» в контексте настоящего описания относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфичным сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными

аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп является эпитопом, продуцируемым соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых обстоятельствах эпитоп может включать части сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[00127] Для определения того, «взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислот» в полипептиде или белке, можно использовать различные методики, известные обычным специалистам в данной области техники. Примеры методик, которые могут быть использованы для определения эпитопа или связывающего домена конкретного антитела или антиген связывающего домена, включают, например, рутинный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), мутационный анализ (например, мутационный анализ с аланиновым сканированием, мутационный анализ с аргининовым сканированием и т.д.), анализ пептидных блоттингов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463), протеазную защиту и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать такие способы, как удаление 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 которым взаимодействует антитело, является обмен водорода/дейтерия, обнаруживаемый масс-спектрометрией. В общем, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием интересующего белка 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 подвергается 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. Для определения аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, также может использоваться рентгеновская кристаллография.

[00128] Настоящее изобретение дополнительно включает антитела против CD28 и против CD22, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных типичных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 6 данного документа).

[00129] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение обеспечивает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают эпитоп на человеческом CD22, содержащем одну или более аминокислот SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 и/или SEQ ID. NO:36, как определено обменом водород/дейтерий, обнаруженным масс-спектрометрией, как указано в примерах 3 и 4.

[00130] Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела анти-CD28 и/или анти-CD22, которые конкурируют за связывание с CD28 и/или CD22 с любым из конкретных типичных антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как приведено в таблице 6 настоящего документа).

[00131] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает человеческий CD28, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает человеческий CD22, где первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD28 в качестве любого из конкретных примерных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или где второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD22, что и любой из конкретных примерных CD22-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

[00132] Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает человеческий CD28, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает человеческий CD22, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 с любым из конкретных примерных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD22 с любым из конкретных примерных CD22-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

[00133] Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, что и референсная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, или конкурирует с ней. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на CD28 (или CD22), что и референсная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, референсной биспецифичной молекуле сначала позволяют связываться с белком CD28 (или белком CD22). Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с молекулой CD28 (или CD22). Если тестируемое антитело способно связываться с CD28 (или CD22) после насыщения связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом CD28 (или CD22), отличным от референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой CD28 (или CD22) после насыщения связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD28 (или CD22) в качестве эпитопа, связанного референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой по

изобретению. Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, анализ пептидных мутаций и связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела вызвано связыванием с тем же эпитопом, что и референсная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, *Viasore*, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами воплощения настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990: 50: 1495-1502). Альтернативно, два антигенсвязывающих белка считаются связывающимися с одним и тем же эпитопом, если практически 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.

[00134] Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методология связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации референсной антигенсвязывающей молекуле позволяют связываться с белком CD28 (или белком CD22) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD28 (или CD22). Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой CD28 (или CD22) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания референсной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD28 (или CD22). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD28 (или CD22), то делается вывод, что тестируемое антитело и референсная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD28 (или CD22). Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело, но может стерически блокировать связывание референсного антитела посредством связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул

[00135] Антигенсвязывающие домены, специфичные для конкретных антигенов,

можно получить с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфичных для двух разных антигенов (например, CD28 и CD22), можно соответствующим образом расположить относительно друг друга для получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с использованием обычных способов. (Обсуждение примерных форматов биспецифичных антител, которые можно использовать для конструирования биспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, приведено в другом месте в настоящем документе). В некоторых вариантах воплощения один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одна или более тяжелых и/или легких цепей биспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител) первоначально выделяют химерные антитела с высоким сродством к конкретному антигену (например, CD28 или CD22), имеющему вариабельную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуются и выбираются по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Константные области мыши заменяются желаемой константной областью человека для создания полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифичные антиген-связывающие молекулы по настоящему изобретению.

[00136] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул человека могут использоваться генно-инженерные животные. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна перестраивать и экспрессировать эндогенную вариабельную последовательность легкой цепи иммуноглобулина мыши, при этом мышь экспрессирует только один или два вариабельных домена легкой цепи человека, кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с константным геном каппа мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая включает вариабельный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена вариабельной области легкой цепи человека. (См., например, Патент США 2011/0195454, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, для подробного обсуждения таких сконструированных мышей и их использования для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул).

Биоэквиваленты

[00137] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых в

описанных антителах, но которые сохраняют способность связывать CD28 и/или CD22. Такие варианты молекул содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антигенсвязывающих молекул. Аналогичным образом, антигенсвязывающие молекулы, кодирующие последовательности ДНК по настоящему изобретению, охватывают последовательности, включающие одно или более добавлений, делеций или замен в сравнении с раскрываемой последовательностью, однако кодируют антигенсвязывающую молекулу, которая по существу биоэквивалентна предлагаемым антигенсвязывающим молекулам по изобретению. Примеры таких вариантов аминокислот и последовательностей ДНК обсуждались выше.

[00138] Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые биоэквивалентны любой из типичных антигенсвязывающих молекул, представленных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значительной разницы при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо в единичной, либо в многократной дозе. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, и они не важны для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом употреблении, и различия считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата

[00139] В одном варианте воплощения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

[00140] В одном варианте воплощения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно один или более раз переключить между референсным 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.

[00141] В одном варианте воплощения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для состояния или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы известны.

[00142] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, 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) в тесте *in vitro*, который коррелировал с данными биодоступности человека *in vivo* и позволял их обоснованно прогнозировать; (c) в тесте *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, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[00143] Биоэквивалентные варианты примерных биспецифичных антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не необходимых для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать примерные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем документе, содержащие изменения аминокислот, которые изменяют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и межвидовая перекрестная реактивность

[00144] Настоящее изобретение, в соответствии с некоторыми вариантами воплощения, обеспечивает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека, но не с CD28 других видов. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD22 человека, но не с CD22 других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и с CD28 одного или более видов, не относящихся к человеку; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD22 человека и с CD22 одного или более видов, кроме человека.

[00145] Согласно некоторым примерным вариантам воплощения изобретения предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD28 и/или человеческим CD22 и могут связываться или не связываться, в зависимости от случая, с одной или более CD28 и/или CD22 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, резуса или шимпанзе. Например, в конкретном примерном варианте воплощения настоящего изобретения представлены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD28 человека и CD28 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD22 человека.

Иммуноконъюгаты

[00146] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы,

конъюгированные с терапевтическим компонентом («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, вредный для клеток. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, WO 05/103081, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Терапевтический состав и введение

[00147] Настоящее изобретение предоставляет фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих рецептов можно найти в рецептурах, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липиды (катионные или анионные), содержащие везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

[00148] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифичная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению используется для терапевтических целей у взрослого пациента, может быть полезным внутривенное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, как правило, в разовой дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и режимы введения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, прогресс пациента можно контролировать путем периодической оценки, и дозу можно корректировать соответствующим образом. Более того, межвидовое масштабирование дозировок может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8: 1351).

[00149] Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы

для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, помещение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути, но не ограничиваются ими. Композицию можно вводить любым удобным путем, например инфузией или болюсной инъекцией, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника в целом и т. д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

[00150] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, легко может найти применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению устройство для доставки в виде шприца-ручки. Такое устройство доставки шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприце-ручке обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж опустеет, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки шприце-ручке сменный картридж отсутствует. Чаще одноразовое устройство для доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство утилизируется.

[00151] Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению используются многочисленные многоразовые ручки и автоинжекторы. Примеры включают, без ограничений, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), шприц-ручки NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), шприц-ручки OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), помимо прочих. Примеры одноразовых устройств для доставки шприца-ручки, имеющих применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, без ограничений, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier,

Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), помимо прочих.

[00152] В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте воплощения можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). В другом варианте воплощения можно использовать полимерные материалы; см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте воплощения система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует лишь части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

[00153] Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций могут быть приготовлены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т. д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (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 сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

[00154] Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в стандартной дозе, подходящей для соответствия дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы для других лекарственных форм указанное выше антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг.

Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул

[00155] Настоящее изобретение включает способы, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей анти-CD28-антитело или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает CD28 и антиген-мишень (например, CD22). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В контексте данного документа. выражение «нуждающийся в этом индивид» означает человека или животное, не являющееся человеком, которое проявляет один или более симптомов или признаков рака (например, индивид, страдающий опухолью или страдающий от любого из видов рака, упомянутых в данном документе ниже), или кто иным образом выиграет от ингибирования или снижения активности CD22 или истощения клеток CD22+.

[00156] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению (и терапевтические композиции, содержащие их) полезны, среди прочего, для лечения любого заболевания или расстройства, при котором могут быть полезными стимуляция, активация и/или нацеливание на иммунный ответ. В частности, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы анти-CD28/анти-CD22 по настоящему изобретению можно использовать для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или расстройства, связанного или опосредованного экспрессией или активностью CD22 или пролиферацией клеток CD22+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих CD22, в присутствии эффекторных клеток, например Т-клеток. Клетки, экспрессирующие CD22, которые можно ингибировать или убивать с использованием биспецифичных антигенсвязывающих молекул по изобретению, включают, например, злокачественные В-клетки.

[00157] Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению можно использовать для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в крови, костном мозге, лимфатических узлах (например, тимусе, селезенке), толстой кишке, печени, легких, груди, почке, центральной нервной системе и мочевом пузыре. Согласно некоторым примерным вариантам воплощения биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению используются для лечения нарушения пролиферации В-клеток.

[00158] Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у индивида. Используемый в данном документе термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток у индивида после лечения при помощи противораковой терапии.

[00159] Согласно некоторым аспектам, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией CD22 (например, пролиферативного нарушения В-клеток), включающие введение индивиду одной или более биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте в настоящем

документе. после того, как было показано, что индивид невосприимчив к другим типам противораковой терапии. Например, настоящее изобретение включает способы лечения пролиферации В-клеток, включающие введение пациенту биспецифичной антигенсвязывающей молекулы анти-CD28/анти-CD22 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как индивид получил стандартную помощь для пациентов, страдающих от рака, например, В-клеточного пролиферативного расстройства. В других аспектах биспецифичная антигенсвязывающая молекула по изобретению (биспецифичная антигенсвязывающая молекула анти-CD28/анти-CD22), содержащая домен Fc IgG4, первоначально вводится индивиду в один или более моментов времени (например, для обеспечения надежного начального снижения количества клеток рака простаты) с последующим введением эквивалентной биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей другой домен IgG, такой как домен Fc IgG1, в следующие моменты времени. Предполагается, что антитела к CD28/CD22 по изобретению можно использовать в сочетании с другими биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, такими как биспецифичное антитело против CD20/CD3. Также предполагается, что биспецифичные антитела по изобретению будут использоваться в сочетании с ингибиторами контрольной точки, например, теми, которые нацелены на PD-1 и CTLA-4 и на другие мишени. Может быть выгодно объединить два биспецифичных антитела, которые нацелены на один и тот же опухолевый антиген (например, CD22), но с одним из биспецифичных антител, нацеленным на CD3 на Т-клетках, и другим антителом, нацеленным на молекулу костимулятора, такую как CD28. Эта комбинация может использоваться отдельно для усиления уничтожения опухолевых клеток или может использоваться в комбинации с ингибитором контрольной точки.

Комбинированные способы лечения и составы

[00160] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любые из типичных антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций индивидуам, нуждающимся в этом.

[00161] Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, включают, например, химиотерапию, лучевую терапию, ингибиторы контрольных точек, которые нацелены на PD-1 (например, антитело анти-PD-1, такое как пембролизумаб, ниволумаб или цемиплимаб, см. Патент США 9 987500, HCVR/LCVR SEQ ID NO 162/170), CTLA-4, LAG3, TIM3 и другие, бивалентные костимулирующие агонисты двухвалентных антител, которые нацелены на такие молекулы, как GITR, OX40, 4-1BB и другие, биспецифичные антитела к CD3x (см., например, Патент США 9657102 (REGN1979), WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 и WO2018/058001A1), другие антитела, нацеленные на CD22 X CD3,

CD22 X CD28, или которые нацелены на CD20 X CD3 и другие костимулирующие биспецифичные антитела к CD28.

[00162] Другие агенты, которые можно с пользой вводить в комбинации с антителами по изобретению, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 или их соответствующие рецепторы. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие биспецифичную антигенсвязывающую молекулу анти-CD28/анти-CD22, как раскрыто в данном документе) также можно вводить как часть терапевтического режима, включающего одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из «ICE»: ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); «DHAP»: дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозинарабинозид, Ara-C), цисплатин (например, Platinol®-AQ); и «ESHAP»: этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), цитарабин в высоких дозах, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

[00163] Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или более из: VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, siRNA, рибозим, пептидное тело, нанотело или фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент; F(ab')₂-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; dAb-фрагмент; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные единицы распознавания). Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВП. Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или обычную химиотерапию, или лечение биологическим препаратом, включая ингибиторы контрольных точек или другие биспецифичные антитела.

[00164] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более химиотерапевтическим агентом. Примеры химиотерапевтических агентов включают: алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytosan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые

иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексамин; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антагонисты гормонов надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксамин; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазононовая кислота; триазиквон; 2,2',2"- трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (Taxotere™; Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В это определение также включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5) - имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

[00165] Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно до, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[00166] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула настоящего изобретения составлена совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте настоящего документа.

Схемы введения

[00167] Согласно некоторым вариантам воплощения настоящего изобретения, несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против CD28 или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывает CD22 и CD28) можно вводить индивиду в течение определенного периода действия. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение индивиду, множественных доз антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Используемый в данном документе термин «последовательное введение» означает, что каждая доза антигенсвязывающей молекулы вводится индивиду в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующим введением одной или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, с последующим введением одной или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

[00168] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Таким образом, «начальная доза» является дозой, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая «исходная дозой»); «вторичные дозы» являются дозами, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут все содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах воплощения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, увеличивается или уменьшается в зависимости от ситуации) на протяжении курса лечения. В некоторых вариантах воплощения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения как «ударные дозы» с последующими дозами, которые вводятся реже (например, «поддерживающие дозы»).

[00169] В одном примерном варианте воплощения настоящего изобретения каждая вторичная и/или третичная доза вводится от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5,

5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», в контексте данного документа, означает, в последовательности многократных введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которая вводится пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00170] Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против CD28 или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывает CD22 и CD28). Например, в некоторых вариантах воплощения пациенту вводят только однократную вторичную дозу. В других вариантах воплощения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых вариантах воплощения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах воплощения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00171] В вариантах воплощения, включающих несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах воплощения, включающих несколько третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом во время курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[00172] В одном варианте воплощения антигенсвязывающая молекула (например, биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая специфично связывает CD22 и CD28) вводится индивиду в дозе, зависящей от веса. «Доза на основе веса» (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая будет изменяться в зависимости от веса индивида.

[00173] В другом варианте воплощения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифичная антигенсвязывающая молекула вводится индивиду в виде фиксированной дозы. «Фиксированная доза» (например, доза в мг) означает, что одна доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы используется для всех индивидов независимо от каких-либо конкретных факторов, связанных с индивидом, таких как масса. В одном конкретном варианте воплощения фиксированная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по изобретению основана

на заранее определенной массе или возрасте.

[00174] В целом, подходящая доза антигенсвязывающей молекулы по изобретению может находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграммов на килограмм веса тела реципиента, обычно в диапазоне приблизительно от 1 до 50 мг на килограмм веса тела. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифичная антигенсвязывающая молекула могут быть введены в дозах приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

[00175] В некоторых вариантах воплощения антигенсвязывающую молекулу по изобретению вводят в виде фиксированной дозы от приблизительно 25 мг до приблизительно 2500 мг. В некоторых вариантах воплощения антигенсвязывающую молекулу по изобретению вводят в виде фиксированной дозы приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 925 мг, приблизительно 950 мг, приблизительно 975 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 2000 мг или приблизительно 2500 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

Диагностическое применение антител

[00176] Биспецифичные антитела по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения CD28 или CD22, или экспрессирующих CD28, или экспрессирующих CD22 клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело анти-CD28 x анти-CD22 или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.) CD28 или CD22. Примеры диагностических анализов на CD28 или CD22 могут включать, например, контактирование образца, полученного от пациента, с

антителом по изобретению, где антитело помечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы немеченое антитело можно использовать в диагностических целях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе является детектируемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, бетагалактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные примерные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения CD28 или CD22 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS). Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах CD28 или CD22 согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит определяемые количества белка CD28 или CD22 или их фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни CD28 или CD22 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью CD28 или CD22), будут измеряться для первоначального установления исходного уровня или стандарта уровня CD28 или CD22. Затем этот исходный уровень CD28 или CD22 можно сравнить с уровнями CD28 или CD22, измеренными в образцах, полученных от лиц, подозреваемых на наличие заболевания или состояния, связанного с CD28 или CD22.

ПРИМЕРЫ

[00177] Нижеследующие примеры представлены для того, чтобы предоставить обычным специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура дана в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Конструирование антител анти-CD22хCD28

Получение антител анти-CD28

[00178] Антитела против CD28 были получены путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и каппа-легкой цепи иммуноглобулина человека) человеческим белком CD28, слитым с Fc-частью мышиного IgG2a, или клетками, экспрессирующими CD28, или ДНК, кодирующей CD28. Иммунный ответ антител контролировали с помощью CD28-специфичного иммуноанализа. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши,

чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать клеточные линии гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют CD28-специфичные антитела. Используя этот способ, было получено несколько химерных антител против CD28 (т.е. антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к CD28 были выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в Патенте США 2007/0280945A1.

[00179] Некоторые биологические свойства примерных антител против CD28, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Получение антител анти-CD22

[00180] Антитела против CD22 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши (мыши VELOCIMMUNE®, см. выше) антигеном CD22 человека (например, см. hCD22 ecto (D20-R687).hFc, R&D Systems, Catalog# 1968-SL-050; Accession# CAA42006 (см. также Фигуру 3), или путем иммунизации антигеном CD22 человека сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и kappa-легкой цепи иммуноглобулина человека.

[00181] После иммунизации спленоциты собирали у каждой мыши и либо (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования гибридомных клеток и проводили скрининг на специфичность к CD22, либо (2) сортировали В-клетки (как описано в Патенте США 2007/0280945A1) с использованием фрагмента CD22 человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки).

[00182] Первоначально были выделены химерные антитела к CD22, 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 IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела к CD22. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного использования, характеристики связывания с антигеном с высоким сродством и целевой специфичности находятся в переменной области.

Получение биспецифичных антител, связывающих CD28 и CD22

[00183] Биспецифичные антитела, содержащие анти-CD22-специфичный связывающий домен и анти-CD28-специфичный связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методологий, в которых антигенсвязывающий домен анти-CD22 и антигенсвязывающий домен анти-CD28 каждый содержат разные, отдельные HCVR в паре с общим LCVR. В некоторых случаях биспецифичные антитела были сконструированы с использованием тяжелой цепи из

антитела против CD28, тяжелой цепи из антитела против CD22 и общей легкой цепи (см. таблицу 1).

[00184] Биспецифичные антитела, созданные в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т.е. связывающие плечи). Первый антигенсвязывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи, полученную из антитела против CD28 («CD28-VH»), а второй антигенсвязывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи, полученную из антитела против CD22 («CD22 -VH»). И анти-CD22, и анти-CD28 имеют общую легкую цепь. Спаривание CD28-VH/CD22-VH создает антигенсвязывающие домены, которые специфично распознают CD28 на Т-клетках и CD22 на опухолевых клетках.

Пример 2. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельной области тяжелой и легкой цепей

[00185] В **таблице 1** представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR избранных антител к CD22 по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в **таблице 2**.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей антител к CD22

	SEQ ID NO:							
Обозначение антител	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb33037P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb33041P2	18	20	22	24	10	12	14	16

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот антител к CD22

	SEQ ID NO:							
Обозначение антител	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb33037P2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb33041P2	17	19	21	23	9	11	13	15

[00186] В **таблице 3** представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR и LCVR), CDR избранных антител анти-CD28 по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в **таблице 4**.

Таблица 3: Идентификаторы аминокислотных последовательностей антител к CD28

	SEQ ID NO:

Обозначение антител	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb14226P2	26	28	30	32	10	12	14	16

Таблица 4: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот антитела к CD28

		SEQ ID NO:						
Обозначение антител	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb14226P2	25	27	29	31	9	11	13	15

[00187] Сводная информация о составных частях различных сконструированных биспецифичных антител анти-CD22ханти-CD28 представлена в **таблице 5**. В **таблицах 6** и **7** перечислены HCVR, LCVR, CDR и идентификаторы последовательностей тяжелой и легкой цепей биспецифичных антител.

Таблица 5: Сводная информация о составных частях биспецифичных антител анти-CD22 х анти-CD28

Идентификатор биспецифичных антител	Анти-CD22	Анти-CD28	Общая варибельная область легкой цепи
	Антиген- связывающий домен	Антиген- связывающий домен	
	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	
REGN5837	mAb33037P2	mAb14226P2	ULC3-20
REGN5838	mAb33041P2	mAb14226P2	ULC3-20

[00188] **Таблица 6** показывает идентификаторы аминокислотных последовательностей для биспецифичных анти-CD22 х анти-CD28 антител, приведенных в данном документе в качестве примеров. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в **таблице 7**.

Таблица 6: Аминокислотные последовательности биспецифичных антител анти-CD22 x анти-CD28

Идентификатор биспецифичных антител	Анти-CD28 Первый антигенсвязывающий домен (D1)				Анти-CD22 Второй антигенсвязывающий домен (D2)				Общая переменная область легкой цепи			
	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR 2	D1- HCDR3	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR 2	D2- HCDR3	LCV R	LCDR1	LCDR2	LCDR 3
REGN5837	26	28	30	32	2	4	6	8	10	12	14	16
REGN5838	26	28	30	32	18	20	22	24	10	12	14	16

Таблица 7: Последовательности нуклеиновых кислот биспецифичных антител анти-CD22 x анти-CD28

Идентификатор биспецифичных антител	Анти-CD28 Первый антигенсвязывающий домен (D1)				Анти-CD22 Второй антигенсвязывающий домен (D2)				Общая переменная область легкой цепи			
	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR 2	D1- HCDR3	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR 2	D2- HCDR3	LCV R	LCDR1	LCDR2	LCDR 3
REGN5837	25	27	29	31	1	3	5	7	9	11	13	15
REGN5838	25	27	29	31	17	19	21	23	9	11	13	15

Пример 3: Картирование эпитопа связывания REGN5837 с CD22 посредством водородно-дейтериевого обмена

[00189] Картирование эпитопов с обменом H/D с помощью масс-спектрометрии (HDX-MS) было выполнено для определения аминокислотных остатков CD22 (рекомбинантный человеческий CD22, SEQ ID NO:50), взаимодействующего с H4sH33037P2 (см. таблицу 1, пара HCVR/LCVR SEQ ID NO:2/10) (моноклональное антитело против hCD22; исходное антитело против hCD22 REGN5837). Общее описание способа обмена H/D приведено в, например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00190] Эксперименты HDX-MS были выполнены на интегрированной платформе HDX/MS, состоящей из системы Leaptec HDX PAL для мечения дейтерием и гашения, Waters Acquity M-класса (вспомогательный менеджер растворителей) для разложения и загрузки образца, Waters Acquity M-Class (менеджер растворителей μ Binary) для аналитического градиента и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для измерения массы пептидов.

[00191] Раствор для мечения готовили в виде буфера PBS в D₂O 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 11 мкл CD22.mmH (REGN5140 (SEQ ID NO:50), 56,7 мкМ) или CD22.mmH, предварительно смешанных с H4sH33037P2 (см. выше) в молярном соотношении 1 : 0,6 (комплекс антиген-антитело), инкубировали при 20°C с 44 мкл раствора для мечения D₂O в разные моменты времени в двойных повторах (например, недейтерированный контроль=0 секунд; меченый дейтерием в течение 5 минут и 10 минут). Реакцию дейтерирования гасили добавлением 55 мкл предварительно охлажденного буфера гашения (0,5 М ТСЕР-НСl, 8 М мочевины и 1% муравьиная кислота) к каждому образцу в течение 5 минут инкубации при 20°C. Затем замороженный 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 (подвижная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали масс-спектрометрией Q Exactive HF в режиме ЖХ-МС/МС или ЖХ-МС.

[00192] Данные ЖХ-МС/МС недейтерированного образца CD22 сравнивали с базой данных, включающей CD22 и его рандомизированную последовательность, с использованием поисковой машины Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска (в программе 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 поглощения дейтерия каждым пептидом, обнаруженным с помощью ЖХ-МС, из всех дейтерированных образцов. Для расчета поглощения дейтерия (D) и процента поглощения дейтерия (% D) для данного пептида использовалась масса центроида (средневзвешенная масса) в каждый момент

Поглощение дейтерия (D-поглощение)	=	Средняя масса (дейтерированная)- Средняя масса (недейтерированная)
Процент поглощения дейтерия (%D)	=	D-поглощение для пептида в каждой временной точке X 100% Максимум D-поглощения пептида (определено в ELN)

времени (см. ниже).

[00193] Всего были идентифицированы 427 пептидов из hCD22.mmH (SEQ ID NO:50) как из одного только hCD22.mmH, так и из hCD22.mmH в комплексе с образцами H4sH33037P2 (пара HCVR/LCVR из SEQ ID NO:2/10), что составляет 92,0% покрытия последовательности hCD22. Любой пептид, который демонстрировал дифференциальное процентное значение поглощения D выше 5%, был определен как значительно защищенный (таблица 8). Для hCD22.mmH пептиды, соответствующие аминокислотам 481-505 (NVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNS; SEQ ID NO:57) и 523-537 (FWEKNGRLLGKESQLNF; SEQ ID NO:58), были в значительной степени защищены при помощи H4sH33037P2.

Таблица 8: Избранные пептиды CD22.mmH со значительной защитой при связывании с H4sH33037P2

		5 мин			10 мин			
		REGN5 140	REGN514 0	ΔD	REGN51 40	REGN51 40	ΔD	Δ%D
			+			+		
CD22			H4sH3303 7P2			H4sH330 37P2		
Остатк и	Заряд (+)	Центро ид MH ⁺	Центроид MH ⁺		Центроид д MH ⁺	Центроид д MH ⁺		
481-492	2	1477,27	1476,94	-0,33	1477,51	1477,01	-0,50	-5,7
481-497	4	2059,98	2059,38	-0,60	2060,24	2059,62	-0,62	-5,9
481-499	4	2277,09	2276,48	-0,61	2277,33	2276,65	-0,68	-5,4
482-490	3	1108,33	1108,02	-0,32	1108,46	1108,20	-0,26	-5,99
484-492	3	1136,43	1136,22	-0,22	1136,56	1136,29	-0,27	-5,08
484-499	4	1935,26	1934,65	-0,61	1935,40	1934,69	-0,70	-6,82
488-505	3	2043,24	2042,65	-0,60	2043,42	2042,69	-0,73	-5,52
489-497	3	1113,62	1113,13	-0,49	1113,71	1113,17	-0,53	-10,63

489-499	3	1330,85	1330,31	-0,54	1330,93	1330,32	-0,61	-8,96
489-505	2	1927,04	1926,45	-0,59	1927,17	1926,46	-0,70	-5,76
489-505	3	1928,14	1927,55	-0,59	1928,26	1927,61	-0,65	-5,56
491-499	2	1074,18	1073,78	-0,41	1074,19	1073,74	-0,45	-8,94
491-499	3	1075,28	1074,83	-0,45	1075,31	1074,80	-0,51	-9,97
491-505	2	1671,53	1671,05	-0,48	1671,59	1671,11	-0,48	-5,02
491-505	3	1672,53	1672,04	-0,48	1672,59	1672,10	-0,49	-5,09
491-505	4	1673,57	1673,08	-0,50	1673,64	1673,14	-0,50	-5,19
493-505	2	1415,81	1415,33	-0,48	1415,87	1415,40	-0,47	-5,91
523-531	2	1167,25	1166,91	-0,34	1167,40	1166,97	-0,43	-6,87
523-531	3	1168,23	1167,88	-0,36	1168,41	1167,93	-0,48	-7,48
523-534	4	1484,62	1484,25	-0,37	1484,68	1484,12	-0,56	-5,80
523-536	3	1699,57	1699,11	-0,46	1699,77	1699,24	-0,53	-5,16
524-534	3	1336,24	1335,83	-0,41	1336,31	1335,93	-0,38	-5,50
526-537	2	1348,48	1348,17	-0,32	1348,76	1348,27	-0,49	-5,03
527-537	2	1220,04	1219,62	-0,42	1220,31	1219,81	-0,50	-6,44
528-534	2	776,80	776,55	-0,26	776,92	776,60	-0,32	-7,19
528-536	2	992,76	992,44	-0,32	992,95	992,57	-0,38	-6,30
528-537	2	1105,90	1105,60	-0,30	1106,06	1105,71	-0,35	-5,11
528-537	3	1106,65	1106,35	-0,30	1106,83	1106,47	-0,37	-5,20

Пример 4: Картирование эпитопа связывания H4sH33041P2 с CD22 посредством водородно-дейтериевого обмена

[00194] Картирование эпитопов с обменом H/D с помощью масс спектрометрии (HDX-MS) было выполнено для определения аминокислотных остатков CD22 (рекомбинантный человеческий CD22, SEQ ID NO:50), взаимодействующего с H4sH33041P2 (моноклональное антитело против hCD22, имеющее пару HCVR/LCVR SEQ ID NO:18/10), исходное антитело против hCD22 REGN5838). Общее описание способа обмена H/D приведено в, например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00195] Эксперименты HDX-MS были выполнены на интегрированной платформе HDX/MS, состоящей из системы Leaptec HDX PAL для мечения дейтерием и гашения, Waters Acquity M- Class (вспомогательный насос) для разложения и загрузки образца, Waters Acquity M-Class (бинарный насос) для аналитического градиента и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для измерения массы пептидов.

[00196] Раствор для мечения готовили в виде буфера PBS в D₂O при pD 7,0 (10 mM фосфатный буфер, 140 mM NaCl и 3 mM KCl, что эквивалентно pH 7,4 при 25°C). Для

мечения дейтерием 11 мкл CD22.mmH (REGN5140 (SEQ ID NO:50), 56,7 мкМ) или CD22.mmH, предварительно смешанных с H4sH33041P2 в молярном соотношении 1 : 0,6 (комплекс антиген-антитело), инкубировали при 20°C с 44 мкл раствора для мечения D₂O в разные моменты времени в двойных повторах (например, недейтерированный контроль=0 секунд; меченый дейтерием в течение 5 минут и 10 минут). Реакцию дейтерирования гасили добавлением 55 мкл предварительно охлажденного буфера гашения (0,5 М ТСЕР-НСl, 8 М мочевины и 1% муравьиная кислота) к каждому образцу в течение 5 минут инкубации при 20°C. Затем замороженный 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 (подвижная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали масс-спектрометрией Q Exactive HF в режиме ЖХ-МС/МС или ЖХ-МС.

[00197] Данные ЖХ-МС/МС недейтерированного образца CD22 сравнивали с базой данных, включающей CD22 и его рандомизированную последовательность, с использованием поисковой машины 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 поглощения дейтерия каждым пептидом, обнаруженным с помощью ЖХ-МС, из всех дейтерированных образцов. Для расчета поглощения дейтерия (D) и процента поглощения дейтерия (% D) для данного пептида использовалась масса центроида (средневзвешенная масса) в каждый момент

Поглощение дейтерия (D-поглощение)	=	Средняя масса (дейтерированная)- Средняя масса (недейтерированная)
Процент поглощения дейтерия (%D)	=	D-поглощение для пептида в каждой временной точке X 100% Максимум D-поглощения пептида (определено в ELN)

времени как указано ниже.

[00198] Всего были идентифицированы 454 пептида из hCD22.mmH (SEQ ID NO:50) как из одного только hCD22.mmH, так и из hCD22.mmH в комплексе с образцами H4sH33041P2, что составляет 90,5% покрытия последовательности hCD22. Любой пептид, который проявлял дифференциальное процентное значение поглощения D выше 5%, был определен как значительно защищенный. Для hCD22.mmH пептиды, соответствующие аминокислотам 246-277 (CEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNL; SEQ ID NO:59), были в значительной степени защищены H4sH33041P2. В **таблице 9** представлены результаты для выбранных пептидов со значительной защитой при связывании с

H4sH33041P2.

Таблица 9: Избранные пептиды CD22.mH со значительной защитой при связывании с H4sH33041P2

		5 мин			10 мин				
		REGN5 140	REGN51 40		REGN51 40	REGN51 40			
			+			+			
CD22			H4sH330 41P2			H4sH330 41P2			
Остатк и	Заряд (+)	Центро ид МН ⁺	Центрои д МН ⁺	ΔD	Центрои д МН ⁺	Центрои д МН ⁺	ΔD	$\Delta \% D$	
246-260	2	1695,69	1693,75	-1,94	1695,81	1693,88	-1,94	-20,2	
247-255	1	1014,95	1013,86	-1,09	1015,09	1013,90	-1,19	-23,7	
248-255	1	885,67	884,67	-1,00	885,72	884,68	-1,03	-25,4	
248-257	1	1088,87	1087,06	-1,81	1088,95	1087,08	-1,86	-32,8	
248-258	1	1188,86	1186,62	-2,24	1188,80	1186,76	-2,03	-33,4	
248-260	1	1462,34	1460,14	-2,20	1462,56	1460,37	-2,19	-27,5	
248-260	2	1462,38	1460,87	-1,51	1462,50	1461,05	-1,45	-18,5	
248-267	2	2179,41	2177,73	-1,68	2179,48	2177,78	-1,70	-12,4	
250-255	1	698,73	698,06	-0,68	698,74	698,07	-0,67	-28,2	
256-260	1	595,67	595,38	-0,29	595,77	595,43	-0,34	-13,2	
256-277	3	2506,39	2505,08	-1,31	2506,57	2505,28	-1,28	-8,1	
258-277	3	2303,55	2302,37	-1,18	2303,70	2302,61	-1,09	-7,9	
258-277	4	2304,39	2303,05	-1,34	2304,54	2303,17	-1,37	-9,4	
259-274	3	1863,23	1862,24	-1,00	1863,34	1862,39	-0,95	-8,7	
259-276	3	2090,99	2089,88	-1,11	2091,03	2090,10	-0,93	-8,0	
259-277	2	2202,69	2201,88	-0,82	2202,82	2201,99	-0,83	-6,1	
259-277	3	2204,00	2202,93	-1,07	2204,07	2203,10	-0,97	-7,5	
260-267	2	923,71	923,41	-0,30	923,83	923,53	-0,30	-6,2	
261-267	1	736,43	736,18	-0,25	736,55	736,26	-0,29	-6,7	
261-267	2	737,43	737,18	-0,26	737,55	737,28	-0,28	-6,7	
261-272	2	1339,48	1338,86	-0,62	1339,58	1338,99	-0,59	-7,5	
261-272	3	1340,56	1339,91	-0,65	1340,66	1340,07	-0,59	-7,8	

261-273	2	1487,02	1486,00	-1,02	1487,11	1486,15	-0,96	-11,2
261-273	3	1488,10	1487,01	-1,09	1488,13	1487,19	-0,94	-11,5
261-274	2	1588,74	1587,70	-1,04	1588,85	1587,90	-0,94	-10,3
261-276	2	1816,39	1815,41	-0,98	1816,48	1815,57	-0,92	-8,5
261-277	2	1929,27	1929,31	-1,04	1928,23	1928,38	-0,93	-8,2
261-277	3	1930,39	1929,37	-1,01	1930,45	1929,55	-0,89	-7,9
261-277	4	1931,34	1930,30	-1,05	1931,40	1930,46	-0,94	-8,3
262-267	1	622,98	622,71	-0,27	623,08	622,80	-0,27	-8,4
262-274	3	1475,17	1474,20	-0,97	1475,28	1473,08	-2,20	-18,0
262-275	4	1590,80	1589,66	-1,13	1590,89	1589,77	-1,12	-11,7
262-276	3	1704,03	1701,62	-2,41	1704,09	1701,66	-2,43	-23,3
262-277	2	1816,39	1815,41	-0,98	1816,48	1815,57	-0,92	-8,5
262-277	3	1817,40	1816,38	-1,02	1817,50	1816,57	-0,93	-8,7
264-273	2	1129,77	1128,49	-1,28	1129,74	1128,78	-0,96	-17,5
264-274	2	1231,69	1231,40	-0,29	1231,77	1231,25	-0,52	-5,6
267-276	2	1212,11	1211,38	-0,73	1212,10	1211,47	-0,63	-10,6
267-277	2	1325,86	1325,12	-0,74	1325,83	1325,22	-0,61	-9,4
268-273	2	769,65	768,82	-0,83	769,64	768,88	-0,76	-24,9
268-274	1	870,35	869,46	-0,89	870,28	869,56	-0,73	-20,2
268-274	2	871,36	870,53	-0,83	871,34	870,61	-0,73	-19,4
268-276	2	1099,07	1098,29	-0,79	1099,07	1098,36	-0,70	-13,3
268-277	1	1211,10	1210,45	-0,66	1211,10	1210,45	-0,65	-10,2
268-277	2	1212,11	1211,38	-0,73	1212,10	1211,47	-0,63	-10,6
268-277	3	1212,84	1212,11	-0,73	1212,81	1212,16	-0,64	-10,7

Пример 5: Выведенные из поверхностного плазмонного резонанса средство связывания и кинетические константы биспецифичных антител CD22 xCD28

[00199] Константы равновесной диссоциации (значения K_D) для связывания hCD22.mmH (SEQ ID NO:50) и mfCD22.mmH (SEQ ID NO:51) с очищенным биспецифичным моноклональным антителом против CD22xCD28 или двухвалентным исходным моноклональным антителом против CD22 (см. таблицу 1, mAB33037P2; HCVR/LCVR: SEQ ID NO:2/10) и моноклональным антителом 33041P2; HCVR/LCVR: SEQ ID NO:18/10) определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием прибора Biacore T-200 или Biacore 4000. Поверхность сенсора CM5 Biacore была модифицирована путем аминокислотного связывания с моноклональным мышинным антителом против Fc человека (REGN2567; HCVR/LCVR: SEQ

ID NO:33/34) для захвата очищенных биспецифичных анти-CD22хCD28 или исходных моноклональных антител против CD22 (см. таблицу 1 и 2 для моноклональных антител 33037P2 и моноклональных антител 33041P2). Это исследование связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об/об. поверхностно-активного вещества P20 (рабочий буфер HBS-EP). Различные концентрации hCD22 (SEQ ID NO:50) и mfCD22 (SEQ ID NO:51) с С-концевой гексагистиридиновой меткой мус.мус («гексагистидин», описанный как SEQ ID NO:60), приготовленные в рабочем буфере HBS-EP (от 90 нМ до 3,33 или 0,37 нМ, 3-кратные разведения) наносили на захваченную моноклональными антителами поверхность при скорости потока 30 мкл/мин. Связь CD22.mmH (SEQ ID NO:50) с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 5 минут, а диссоциацию CD22.mmH в рабочем буфере HBS-EP отслеживали в течение 10 минут. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25°C. 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 построения кривой Scrubber 2.0с. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и период полураспада диссоциации ($t^{1/2}$) были рассчитаны из кинетических констант скорости как:

$$K_D(\text{M}) = k_d/k_a, \text{ и } t^{1/2} (\text{мин}) = 0,693/k_d/60$$

[00200] Кинетические параметры связывания CD22 человека и яванского макака с очищенными моноклональными антителами при 25°C показаны ниже в таблицах 10-12.

[00201] Константы равновесной диссоциации (значения K_D) для hCD28.mmH (SEQ ID NO:54) очищенного биспецифичного моноклонального антитела против CD22хCD28 или двухвалентного исходного моноклонального антитела против CD28 (см. таблицы 3 и 4 для моноклонального антитела 14226P2) определяли с применением биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T-200. Поверхность сенсора CM4 Biacore была модифицирована путем связывания амина с моноклональным мышинным антителом против Fc человека (REGN2567; HCVR/LCVR SEQ ID NO:33/34) для захвата очищенного биспецифичного анти-CD22хCD28 или исходного моноклонального антитела против CD28 (см. выше). Это исследование связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об/об. поверхностно-активного вещества P20 (рабочий буфер HBS-EP). Разные концентрации hCD28 с С-концевой гексагистиридиновой меткой мус.мус («гексагистидин», описанный как SEQ ID NO:60), приготовленные в рабочем буфере HBS-EP (в диапазоне от 600 нМ до 2,47 нМ, 3-кратные разведения), наносили на захваченную моноклональными антителами поверхность при скорости потока 50 мкл/мин. Связь CD28.mmH (SEQ ID NO:54) с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 5 минут, а диссоциацию CD28.mmH в рабочем буфере HBS-EP отслеживали в течение 10 минут. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25°C. 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 построения кривой Scrubber 2.0c. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и период полураспада диссоциации ($t_{1/2}$) были рассчитаны из кинетических констант скорости как:

$$K_D (M) = k_d/k_a, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = 0,693/k_d/60$$

[00202] Кинетические параметры связывания CD28 человека с очищенными моноклональными антителами при 25°C показаны ниже в таблице 13.

Таблица 10: Кинетика связывания человеческого CD22.mmH с биспецифичными моноклональными антителами анти-CD22xCD28 при 25°C

№ REG/ № ИНП Ат	№ в перечне	Общепринятое название	Захват мАт (RU)	Связывание 90нМ hCD22.mmH (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
REGN5 837	REGN58 37-L3	CD22xCD28 mAb	379,1 ± 2,4	100,5	1,70E +05	1,49 E-03	8,7 5E-09	7,8
H4sH33 037P2	H4sH330 37P2-L2	CD22 mAb	358,3 ± 2,0	192,6	1,95E +05	1,48 E-03	7,6 0E-09	7,8
REGN5 838	REGN58 38-L4	CD22xCD28 mAb	475,3 ± 5,3	26,7	2,11E +04	3,02 E-04	1,4 3E-08	38,2
H4sH33 041P2	H4sH330 41P2-L2	CD22 mAb	581,7 ± 1,9	61,5	2,05E +04	1,93 E-04	9,4 3E-09	59,8

Таблица 11: Кинетика связывания обезьяньего CD22.mmH (XP_005588899.1) с биспецифичными моноклональными антителами анти-CD22xCD28 при 25°C

№ REG/ № ИНП Ат	№ в перечне	Общепринятое название	Захват мАт (RU)	Связывание 90нМ REGN5280 (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
H4sH33 037P2	H4sH3303 7P2-L2	CD22 mAb	423,8 ± 3,6	112,8	6,55E +04	2,66 E-03	4,0 6E-08	4,3
H4sH33 041P2	H4sH3304 1P2-L2	CD22 mAb	500,9 ± 0,9	13,2	6,83E +03	2,91 E-04	4,2 6E-08	39,8

Таблица 12: Кинетика связывания обезьяньего CD22.mnH (EHH59463.1) с биспецифичными моноклональными антителами анти-CD22xCD28 при 25°C

№ REG/ № ИНП Ат	№ в перечне	Общепри нятое название	Захват мАт (RU)	Связыва ние84нМ REGN528 1 (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
H4sH33 037P2	H4sH3303 7P2-L2	CD22 mAb	426,4 ± 1,6	127,5	8,07E +04	2,87 E-03	3,56 E-08	4,0
H4sH33 041P2	H4sH3304 1P2-L2	CD22 mAb	499,7 ± 3,5	10,9	6,59E +03	3,90 E-04	5,92 E-08	29,6

Table 13: Кинетика связывания человеческого CD28.mnH с биспецифичными моноклональными антителами анти-CD22xCD28 при 25°C

№ REG/ № ИНП Ат	№ в перечне	Общепри нятое название	Захват мАт (RU)	Связыва ние 600нМ hCD28.m mH (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
REGN 5837	REGN58 37-L3	CD22xCD 28 mAb	1060,7 ± 7,0	72,9	1,39E+ 04	4,73E -03	3,41E -07	2,4
REGN 5838	REGN58 38-L4	CD22xCD 28 mAb	1289,2 ± 10,5	77,0	1,23E+ 04	4,96E -03	4,04E -07	2,3
REGN 5705	REGN57 05-L2	CD28 mAb	564,5 ± 5,2	88,4	1,31E+ 04	4,80E -03	3,65E -07	2,4

Пример 6. Специфичность связывания биспецифичных антител анти-CD28 и анти-CD22xCD28 с клеточными линиями - мишенями (Nalm6), линиями эффекторных клеток (Jurkat) и Т- и В-клетками яванского макака с применением проточной цитометрии

[00203] Для определения связывания биспецифичных антител CD22xCD28 с человеческими клетками Nalm6, экспрессирующими CD22, и человеческими клетками Jurkat, экспрессирующими CD28, и с Т- (CD28+) и В- (CD22+) клетками яванского макака применяли проточный цитометрический анализ. Вкратце, 1×10^5 клеток/лунку инкубировали в течение 30 минут при 4°C с серийным разведением биспецифичных антител CD22xCD28 или H4sH15260P (изотипический контроль человеческого IgG4-антитела, которое связывает человеческий антиген без перекрестной реактивности с CD28 или CD22 человека или яванского макака) в диапазоне от 133 нМ до 61 пМ для клеток Jurkat и Nalm6. МКПК яванского макака инкубировали с одной концентрацией антитела 67 нМ. После инкубации клетки дважды промывали холодным PBS, содержащим 1% профильтрованного FBS, и к клеткам добавляли конъюгированное с PE вторичное антитело против человека и

инкубировали в течение дополнительных 30 минут. В лунки с МКПК яванского макака добавляли дополнительный коктейль фенотипических антител (анти-CD2, анти-CD20, анти-CD16, анти-CD14). Лунки, не содержащие антител или содержащие только вторичные антитела, использовали в качестве контроля.

[00204] После инкубации со вторичным антителом клетки промывали, ресуспендировали в 200 мкл холодного PBS, содержащего 1% профильтрованного FBS, и анализировали проточной цитометрией на BD LSR_Fortessa. Т-клетки яванского макака были идентифицированы как CD2+/CD16- и В-клетки как CD20+. Значения EC_{50} для связывания FACS рассчитывали с использованием четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа в программе Prism.

[00205] В таблице 14 представлены данные связывания биспецифичных антител CD22xCD28 с поверхностью клеточных линий, экспрессирующих CD22, по данным проточной цитометрии. В таблице 14 также представлены данные связывания биспецифичных антител CD22xCD28 с поверхностью клеточных линий, экспрессирующих человеческий CD28, по данным проточной цитометрии.

[00206] REGN5837, связанный с клетками Nalm6, имеет значение EC_{50} 1,3E-08M. REGN5838, связанное с клетками Nalm6, имеет значение EC_{50} 1,8E-08M. Антитело изотипического контроля не проявляло никакого связывания с клеточными линиями, экспрессирующими CD22.

[00207] REGN5837, связанный с клетками Jurkat, имеет значение EC_{50} 2,1E-08M. REGN5838, связанное с клетками Jurkat, имеет значение EC_{50} 2,3E-08M. Антитело изотипического контроля не проявляло никакого связывания с клеточными линиями, экспрессирующими CD28.

[00208] Таблица 15 представляет связывание данных биспецифичных антител CD22xCD28 с поверхностью Т- и В-клеток яванского макака (камбоджийского происхождения), как определено с помощью проточной цитометрии.

[00209] REGN5837 связывал В-клетки у 12 из 12 и Т-клетки у 11 из 12 протестированных яванских макаков. Связывание с CD20+ В-клетками варьировало от 12,6- до 30,3-кратного по сравнению со вторичным связыванием, с медианным значением в 15,7 раз. Связывание с CD2+/CD16- Т-клетками варьировало в от 1,2-кратного до 5,2-кратного по сравнению с вторичным связыванием, с медианным значением в 3,5 раза. Положительное связывание было определено как более чем в 1,2 раза превышающее вторичное. REGN5838 связывал В-клетки у 12 из 12 и Т-клетки у 11 из 12 протестированных яванских макаков. Связывание с CD20+ В-клетками варьировало от 6,5-кратного до 13,5-кратного по сравнению с вторичным связыванием со средним значением в 9,3 раза. Связывание с CD2+/CD16- Т-клетками варьировало от 1,2-кратного до 4,7-кратного по сравнению со вторичным связыванием, с медианным значением в 3,8 раза. Положительное связывание было определено как более чем в 1,2 раза превышающее вторичное. Антитело изотипического контроля не проявляло никакого связывания с Т- или В-клетками яванского макака.

Таблица 14: Связывание и результаты кратности связывания для экспериментов проточной цитометрии на сконструированных клетках - мишенях и эффекторных клетках.

PiD антитела	Jurkat FACS [M]	Jurkat FACS - кратность	Nalm6 FACS [M]	Nalm6 FACS - кратность
REGN5837	2,1E-08	198	1,3E-08	12,2
REGN5838	2,3E-08	203	1,8E-08	11,7
Изотипический контроль	Нет связывания	1	Нет связывания	1

Таблица 15: Результаты кратности связывания для экспериментов проточной цитометрии на Т- и В-клетках яванского макака (Суно) (камбоджийского происхождения).

	Связывание В-клеток (Кратность по сравнению с вторичным связыванием)			Связывание Т-клеток (Кратность по сравнению с вторичным связыванием)		
	REGN5837	REGN5838	Изотипический контроль	REGN5837	REGN5838	Изотипический контроль
Суно 1	22,4	12,2	1,3	4,3	4,3	1,2
Суно 2	28	13,4	1,1	5,2	3,9	1,2
Суно 3	22,5	13,5	1	5,2	4,7	1
Суно 4	15,4	7,9	1	1,5	1,4	0,9
Суно 5	13,2	7,4	1	2,9	2,8	1,1
Суно 6	30,3	17	1	3,5	3,7	1,2
Суно 7	19,8	11,9	1	4,1	4	1
Суно 8	10,6	6,5	1,2	3,5	4	1,2
Суно 9	12,8	7,2	1,1	2,6	3	1,1
Суно 10	16	10,2	1,4	3,5	3,8	1,1
Суно 11	14,5	8,4	1,2	1,5	1,4	1
Суно 12	12,6	7,5	1	1,2	1,2	0,8
Медиана	15,7	9,3	1,05	3,5	3,75	1,1

Пример 7. Специфичность связывания биспецифичных антител анти-CD28 и анти-CD22хCD28 с человеческими CD4+ Т-клетками и сконструированными клетками-мишенями путем применения проточной цитометрии

[00210] Проточный цитометрический анализ использовали для исследования связывания биспецифичных CD22 x CD28 (REGN5837; REGN5838) и контрольных антител с эффекторными клетками, экспрессирующими CD28 человека (CD4⁺ Т-клетки человека), и клетками-мишенями, экспрессирующими CD22 человека (HEK293/hCD20/hCD22 и Raji/CD80- и CD86-негативные В-клетки). Клетки HEK293/hCD20 были включены как линия клеток, негативная по CD28 и CD22.

[00211] CD4⁺ Т-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, полученных из лейкоконцентратов от здорового донора. Выделение МКПК осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ объемом 50 мл в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Вкратце, 15 мл Ficoll-Paque PLUS наслаивали в пробирки SepMate на 50 мл с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1 : 2 D-PBS+2% FBS. Последующие шаги выполнялись в соответствии с протоколом производителя SepMate. CD4⁺ Т-клетки впоследствии выделяли из МКПК с использованием наборов человеческих CD4 Microbead от Miltenyi Biotec, следуя инструкциям производителя. Выделенные CD4⁺ Т-клетки замораживали в FBS, содержащей 10% ДМСО, в концентрации 5×10^6 клеток на флакон.

[00212] Клетки-мишени, включая линию клеток HEK293 и В-клетки Raji человека, получали следующим образом.

[00213] Стабильная линия клеток HEK293 (ATCC, # CRL-1573), экспрессирующая человеческий CD20 (аминокислоты от M1 до P297 с регистрационным номером NP_068769.2), была трансдуцирована человеческим CD22 (аминокислоты от M1 до A847 с регистрационным номером NP_001762.2). CD22-положительные клетки человека выделяли с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) и однократно клонировали. Полученная клональная линия клеток (HEK293/hCD20/hCD22 клон E4) поддерживалась в DMEM+10% + П/С/Г+незаменимые аминокислоты с добавлением 500 мкг/мл G418.

[00214] В-клетки Raji человека (ATCC # CCL-86), которые эндогенно экспрессируют CD20, CD22, Fc гамма-рецепторы (FcγR), CD80 и CD86 на поверхности клетки, были генетически модифицированы путем удаления CD80 и CD86 с использованием технологии CRIPSR. CD80 и CD86 являются известными лигандами CD28. Сконструированные Raji/CD80- и CD86-негативные клетки поддерживали в RPMI+10% FBS+пенициллин+стрептомицин+глутамин с добавлением HEPES и пирувата натрия.

[00215] Клетки окрашивали следующим образом.

[00216] Вкратце, CD4⁺ Т-клетки человека, HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 и Raji/CD80- и CD86-негативные клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания, содержащем D-PBS+2% FBS. Клетки Raji инкубировали с мышинным IgG (конечная концентрация 625 мг/мл) для блокирования эндогенных рецепторов Fc-гамма). Вкратце, в 96-луночном планшете инкубировали 2×10^5 клеток/луночку в течение 30-60 минут при 4°C с серийными разведениями антител в диапазоне от 6,1 пМ до 100 нМ. Был включен образец

отрицательного контроля, не содержащий антител. Клетки один раз промывали холодным буфером для окрашивания и инкубировали в течение 30-45 минут с меченым аллофикоцианином (APC) вторичным антителом против человека. После инкубации клетки промывали один раз холодным буфером D-PBS без FBS и инкубировали с красителем LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain (Invitrogen) для различения живых и мертвых клеток в соответствии с инструкциями производителя. Затем клетки фиксировали в буфере BD Cytofix Buffer в соответствии с инструкциями производителя, промывали, ресуспендировали в буфере для окрашивания и анализировали с применением проточной цитометрии на проточном цитометре iQue Screener. Для определения EC_{50} значения средней геометрической интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 9-точечной кривой отклика с использованием GraphPad Prism. Кратность связывания рассчитывали с использованием следующего уравнения:

Кратность связывания =

$\frac{\text{Максимальное геометрическое значение MFI в испытанном диапазоне доз}}{\text{Геометрическое значение MFI фона [0нМ]}}$

Геометрическое значение MFI фона [0нМ]

[00217] Способность биспецифичных антител CD22 x CD28 связываться с CD22 и CD28 человека оценивалась на первичных CD4⁺ Т-клетках человека и сконструированных клетках, сверхэкспрессирующих CD22 (HEK293/hCD20/hCD22) или экспрессирующих эндогенно (Raji/CD80- и CD86-негативные клетки) путем проточной цитометрии. В качестве контроля была включена негативная клеточная линия (HEK293/hCD20).

[00218] Значения EC_{50} /кратность связывания суммированы на Фигуре 1 и в таблице 16.

Таблица 16: Результаты EC_{50} и кратности связывания для экспериментов проточной цитометрии с человеческими CD4⁺ Т-клетками и сконструированными клетками - мишенями:

Антитела	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20 /hCD22		Raji/CD80 и CD86-негативные клетки		Человеческие CD4 ⁺ Т-клетки	
	EC_{50} [М]	Кратность связывания	EC_{50} [М]	Кратность связывания	EC_{50} [М]	Кратность связывания	EC_{50} [М]	Кратность связывания
REGN5837	НО	1,07	НВ	16,44	9,76E-09	38,35	НВ	9,25
REGN5838	НО	1,11	1,14E-08	34,90	1,49E-08	81,74	НВ	10,63

REGN5705	НО	1,11	НО	1,00	НО	1,04	4,13E-09	37,48
Одноплечевой контроль CD28	НО	1,05	НО	1,11	НО	1,07	н/в	10,97
Изотипический контроль	НВ	1,82	НО	1,15	НО	1,08	НО	1,11

Сокращения: НВ=не вычисляемый (обозначено для кривых, в которых связывание не достигло насыщения); НО=не определяли

Таблица 16. Табулированные значения EC_{50} и кратности связывания антител с $CD4^+$ Т-клетками человека и сконструированными клеточными линиями, такими как НЕК293/hCD20, НЕК293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативные В-клетки.

[00219] Как и ожидалось, ни одно из антител к CD28, исходных антител (REGN5705; HCVR/LCVR SEQ ID NO:35/36) или его биспецифичных форматов (REGN5837, REGN5838 и одноплечевой контроль CD28 (SEQ ID NO:48), не связывались с негативными клетками НЕК293/hCD20. Слабое связывание, приблизительно 1,8x при наивысшей концентрации, было обнаружено с антителом изотипического контроля из-за неспецифичного связывания (Фигура 1 и таблица 16).

[00220] Связывание антител анти-CD22 x анти-CD28 наблюдалось на НЕК293/hCD20/hCD22 (16,44x для REGN5837 и 34,9x для REGN5838 с EC_{50} приблизительно 11,4 нМ) и на Raji/CD80- и CD86-негативных клетках (38,35x для REGN5837 с EC_{50} приблизительно 9,76 нМ и 81,74x для REGN5838 с EC_{50} приблизительно 14,9 нМ). Не было обнаружено значительного связывания с одноплечевым CD28 и изотипическим контролем (Фигура 1 и таблица 16).

[00221] Связывание антител, нацеленных на CD28 человека, обнаруживали на первичных $CD4^+$ Т-клетках человека. Исходное антитело к CD28, REGN5705, связывалось 37,48x с EC_{50} приблизительно 4,13 нМ по сравнению с фоном, тогда как биспецифичные антитела, REGN5837, REGN5838 и одноплечевой контроль показали связывание, соответственно, 9,25x, 10,63x и 10,97x. Как и ожидалось, изотипический контроль не связывался с клетками (Фигура 1 и таблица 16).

Пример 8. Костимуляция биспецифичным антителом анти-CD22xCD28 усиливает направленную цитотоксичность, активацию Т-клеток и высвобождение цитокинов под воздействием биспецифичных антител анти-CD20xCD3

[00222] Усиление при помощи CD22xCD28 направленного целевого уничтожения под воздействием CD20xCD3 оценивали в 96-часовом анализе цитотоксичности, нацеленном на клетки Raji, сконструированные таким образом, чтобы отсутствовала экспрессия CD80 и CD86 (Raji-80/86DKO). Вкратце, человеческие МКПК помещали в среду с добавлением RPMI в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитов за счет истощения прилипших макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки Raji-80/86DKO метили 1 мкМ

флуоресцентного отслеживающего красителя CFDA-SE, а наивные МКПК с истощенными клетками метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CellTrace Violet. Меченые клетки-мишени и МКПК (соотношение эффектор/клетка-мишень 10: 1) совместно инкубировали с серийным разведением биспецифичного антитела CD20xCD3, REGN1979, имеющего одно плечо тяжелой цепи, состоящее из SEQ ID NO:42, другое плечо тяжелой цепи, состоящее из SEQ ID NO:43 и легкую цепь SEQ ID NO:44 (диапазон концентраций: от 5 нМ до 0,64 пМ) и фиксированной концентрацией костимулирующих молекул CD22xCD28 REGN5837 или REGN5838, одноплечевым биспецифичным контролем CD28 (REGN5678) или изотипическим контролем IgG4s (H4sH10154P3, изотипическим контролем, содержащим пару HCVR/LCVR SEQ ID NO:37/38) при 2,5 мкг/мл (16,7 нМ) в течение 96 часов при 37°C. Клетки собирали с планшетов и анализировали с помощью FACS на FACS BD LSRFortessa-X20. Для анализа FACS клетки окрашивали реактивным красителем Fixable Live/Dead Far Red (Invitrogen). В каждую лунку непосредственно перед анализом FACS добавляли 20000 счетных шариков, и для каждого образца собирали 10000 шариков. Для оценки специфичности киллинга клетки вводили в живые популяции, меченные CFDA-SE. Был зарегистрирован процент живой популяции, который использовался для расчета выживаемости.

[00223] Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD4, CD8 и CD25. Процент клеток CD8+, экспрессирующих CD25, был представлен как мера активации Т-клеток. Кроме того, по мере пролиферации Т-клеток CellTraceViolet разбавляется, что приводит к более низкому MFI, измеренному с помощью FACS. Таким образом, о пролиферации Т-клеток сообщалось как об уменьшении MFI CellTraceViolet на CD8+ Т-клетках. Значения EC₅₀ для клеток-мишеней Raji, лишенных экспрессии и связывания CD80 и CD86, рассчитывали с использованием четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа в программе Prism.

[00224] Супернатанты этого анализа собирали для анализа уровней цитокинов. Концентрации IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 и IL-2 анализировали с использованием набора Cytometric Bead Array (CBA) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни цитокинов были интерполированы из кривых, построенных по стандартам набора, и представлены в пг/мл. Максимальные уровни цитокинов были рассчитаны с использованием четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа в программе Prism.

[00225] Были исследованы результаты анализов для оценки способности биспецифичного антитела против CD20xCD3 REGN1979 (см. выше) индуцировать нестимулированные Т-клетки человека уничтожать клетки-мишени, экспрессирующие человеческие CD20 и CD22, в комбинации с костимулирующим антителом CD22xCD28 или 1-плечевым CD28 или антителами изотипического контроля.

[00226] REGN1979 активировали и направляли человеческие Т-клетки на истощение клеток Raji, лишенных экспрессии CD80 и CD86, дозозависимым образом. Добавление

фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало цитотоксическую эффективность (EC_{50}) REGN1979 в 3,5-6,4 раза по сравнению с REGN1979 с 1-плечевым CD28 или антителами изотипического контроля. (Таблица 17).

[00227] Наблюдаемый лизис клеток-мишеней, опосредованный REGN1979, был связан с активацией и пролиферацией Т-клеток, как измерено, соответственно, с помощью позитивной регуляции CD25 на CD8+ -клетках или разведения CellTrace violet. Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало эффективность активации и пролиферации Т-клеток, индуцированных REGN1979, соответственно, в 2,1-2,6 раза и 7,4-8,4 раза по сравнению с REGN1979 с одноплечевым антителом к CD28 или изотипическими контрольными антителами (Таблица 17).

[00228] REGN1979 индуцировал высвобождение цитокинов человека. Высвобождение цитокинов, наблюдаемое с REGN1979 в комбинации с биспецифичными антителами CD22xCD28, увеличивалось в присутствии фиксированной концентрации костимулирующих молекул CD22xCD28 с фиксированной концентрацией одноплечевого CD28 или антител изотипического контроля (Таблица 18).

[00229] Таким образом, костимуляция увеличивала эффективность направленной цитотоксичности, активации Т-клеток и высвобождения цитокинов по сравнению с тем, что наблюдалось с CD20xCD3 в сочетании с контрольными антителами.

Таблица 17: Значения EC_{50} для цитотоксичности и активации Т-клеток (среднее из 3 экспериментов)

Антитело	Киллинг клеток		Активация Т-клеток (CD8+/CD25+)		Деление Т-клеток (CellTrace MFI клеток CD8+)	
	EC_{50} [M]	Кратность EC_{50} в сравнении с IgG4s	EC_{50} [M]	Кратность EC_{50} в сравнении с IgG4s	EC_{50} [M]	Кратность EC_{50} в сравнении с IgG4s
REGN5837	1,48E-10	3,5	1,58E-11	2,1	4,81E-12	7,4
REGN5838	8,12E-11	6,4	1,28E-11	2,6	4,23E-12	8,4
1-плечевой CD28	6,37E-10	0,8	3,46E-11	1,0	3,03E-11	1,2
Изотипический контроль IgG4s	5,22E-10	1,0	3,32E-11	1,0	3,55E-11	1,0

Таблица 18: Высвобождение цитокинов (пг/мл)

	REGN5837	REGN5838	1-плечевой CD28	Изотипический контроль IgG4s
IL-4	46	50	33	29
IL-6	907	810	248	283
IL-2	531	270	36	39
IL-10	1917	2555	739	375
TNF α	277	339	100	66
IFN γ	1847	1956	267	160
IL-17A	154	172	41	35

Пример 9: Биоанализы для CD22 биспецифичных антител

[00230] Активация Т-клеток достигается путем стимуляции рецепторов Т-клеток (TCR), которые распознают специфичные пептиды, представленные белками класса I или II главного комплекса гистосовместимости (МНСI или МНСII) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) (Goldrath et al. 1999). Активированный TCR, в свою очередь, инициирует каскад сигнальных событий, которые можно отслеживать с помощью репортерных генов, управляемых различными факторами транскрипции, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор энхансер легкой цепи каппа активированных В-клеток (NF κ B). Затем Т-клеточный ответ дополнительно уточняется путем задействования корецепторов, экспрессируемых конститутивно или индуцибельно на Т-клетках, таких как CD28, CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4), PD-1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток), LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3) или другие молекулы (Sharpe *et al.* 2002). Костимулирующая молекула CD28 активируется своими эндогенными лигандами CD80 или CD86, экспрессируемыми на АПК. CD28 усиливает клеточные сигналы, такие как пути, контролируемые фактором транскрипции NF κ B, после активации TCR. Сопутствующий сигнал CD28 важен для эффективной активации Т-клеток, такой как дифференцировка, пролиферация Т-клеток, высвобождение цитокинов и гибель клеток (Smeets *et al.* 2012).

[00231] Биспецифичные антитела анти-CD22xCD28 были охарактеризованы с помощью репортерного биоанализа на основе люциферазы и функционального анализа IL-2 с использованием первичных CD4⁺ Т-клеток человека.

Анализ на основе люциферазы:

[00232] Анализ репортерных Т-клеток/АПК (антигенпрезентирующих клеток) на основе люциферазы был разработан для оценки влияния активации CD28 на активность NF κ B при взаимодействии с биспецифичными антителами против CD28 x CD22.

Конструирование репортерных Т-клеток:

[00233] Линия клональных репортерных Т-клеток была сконструирована путем трансдукции бессмертных человеческих Т-клеток Jurkat (ATCC # TIB-152) с помощью репортера лентивируса NF κ B-люциферазы (NF κ B-Luc) (от Qiagen) согласно инструкции

производителя. Клональная репортерная линия (Jurkat/NFκB-Luc clone 1C11) поддерживалась в RPMI+10% FBS+пенициллин+стрептомицин+глутамин с добавлением 1 мкг/мл пурамицина.

Конструирование АПК:

[00234] Стабильная клеточная линия HEK293 (ATCC, # CRL-1573), экспрессирующая человеческий CD20 (аминокислоты от M1 до P297 с номером доступа NP_068769.2), была трансдуцирована человеческим CD22 (аминокислоты с M1 по A847 с номером доступа NP_001762.2). CD22-положительные клетки человека выделяли путем сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) и однократно клонировали. Полученная клональная линия клеток (HEK293/hCD20/hCD22 клон E4) поддерживалась в DMEM+10% + П/С/Г+незаменимые аминокислоты с добавлением 500 мкг/мл G418.

[00235] В-клетки Raji человека (ATCC # CCL-86), которые эндогенно экспрессируют CD20, CD22, Fc-гамма-рецепторы (FcγR), CD80 и CD86 на поверхности клетки, были генетически модифицированы путем удаления CD80 и CD86 с использованием технологии CRIPSR. CD80 и CD86 являются известными лигандами CD28. Сконструированные Raji/CD80- и CD86-негативные клетки поддерживали в RPMI+10% FBS+пенициллин+стрептомицин+глутамин с добавлением HEPES и пирувата натрия.

Стимуляция Т-клеток/АПК:

[00236] В этом эксперименте сконструированные репортерные Т-клетки стимулировали с помощью двух биспецифичных антител. Первая стимуляция доставляется активирующим Т-клетки биспецифичным антителом REGN2281, антителом анти-CD20 X анти-CD3 с одним плечом тяжелой цепи, состоящим из SEQ ID NO:39, одним плечом тяжелой цепи, состоящим из SEQ ID NO:40 и с плечом легкой цепи SEQ ID NO:41, нацеленном на молекулы CD3 на сконструированных репортерных Т-клетках и CD20 на HEK293 или на Raji/CD80- и CD86-негативных В-клетках. Первая стимуляция позволяет обойтись без активации TCR их естественными лигандами, которые представляют собой специфичные пептиды, отображаемые на молекулах ГКГ (главного комплекса гистосовместимости). Вторая стимуляция вызывается биспецифичным антителом против CD28 (т.е. биспецифичным антителом анти-CD28 x анти-CD22). Это антитело имитирует активацию CD28 на Т-клетках своими лигандами CD80/CD86, экспрессируемыми на АПК. Оно взаимодействует с CD28 на Т-клетках и CD22 на клетках HEK293 или с Raji/CD80- и CD86-негативными В-клетками и управляет активацией CD28 на сконструированных репортерных Т-клетках. Одновременная активация TCR и CD28 приводит к усилению транскрипционной активности NFκB, что увеличивает продукцию репортерного гена люциферазы.

Схема люциферазного анализа:

[00237] RPMI1640 с добавлением 10% FBS и П/С/Г использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений антител для скрининга биспецифичных антител анти- CD22 x анти-CD28.

[00238] За день до скрининга сконструированные репортерные Т-клетки

культивировали до $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде для культивирования клеток. Серийно разведенные 1 : 3 биспецифичные антитела анти-CD28 x анти-CD22 и контроли тестировали в присутствии постоянной дозы 200 пМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3, см. выше) или REGN1945 (изотипический контроль hIgG4, имеющий пару HCVR/LCVR, SEQ ID NO:45/46). 10-точечное разведение находилось в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ, при этом конечное разведение не содержало антител к CD28.

[00239] Реагенты добавляли в следующем порядке: 1) Фиксированная концентрация конечной дозы 200 пМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3, см. выше) или REGN1945 (изотипический контроль hIgG4, см. выше) добавляли в каждую лунку в 96-луночных белых плоскодонных планшетах; 2) Клетки НЕК293 ресуспендировали до 4×10^5 клеток/мл (конечная концентрация клеток 1×10^4 клеток/лунку) или Raji/CD80- и CD86-негативные В-клетки ресуспендировали до 2×10^6 клеток/мл (конечная концентрация клеток 5×10^4 клеток/лунку) и добавляли в соответствующие планшеты; 3) в соответствующие лунки добавляли серийно разведенные антитела; 4) культивированные в течение ночи репортерные Т-клетки ресуспендировали до 2×10^6 /мл и добавляли в планшеты с конечной концентрацией 5×10^4 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4-6 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ перед добавлением 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega) для лизирования клеток и определения активности люциферазы. Излучаемый свет регистрировали в относительных световых единицах (RLU) на ридере для планшетов Envision (PerkinElmer). Все серийные разведения были протестированы в двух повторах.

[00240] Значения EC_{50} антител определяли путем подгонки данных к четырехпараметрическому логистическому уравнению на кривой зависимости реакции от дозы с 10 точками с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Кратность индукции рассчитывалась по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Максимальное среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Среднее значение RLU фона [0нМ]}}$$

Функциональный анализ IL-2 с применением первичных CD4⁺ Т-клеток человека:

[00241] Функциональный анализ первичных CD4⁺ Т-клеток/АПК был разработан для оценки влияния активации CD28 на продукцию IL-2 при взаимодействии с биспецифичными антителами анти-CD22 x анти-CD28.

Выделение первичных CD4⁺ Т-клеток человека:

[00242] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) выделяли из лейкоконцентратов от здорового донора. Выделение МКПК осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ объемом 50 мл в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Вкратце, 15 мл FicollPaque PLUS наслаивали в пробирки SepMate на 50 мл с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1 : 2 D-PBS+2% FBS. Последующие шаги выполнялись в соответствии с протоколом производителя SepMate. CD4⁺ Т-клетки впоследствии выделяли из МКПК с использованием наборов человеческих CD4 Microbead

от Miltenyi Biotec, следуя инструкциям производителя. Выделенные CD4⁺ Т-клетки замораживали в FBS, содержащем 10% ДМСО, в концентрации 5×10^6 клеток на флакон.

Высвобождение IL-2 из первичных CD4⁺ Т-клеток, обработанных антителами к CD28 :

[00243] В этом анализе первичные CD4⁺ Т-клетки активируются посредством перекрестного связывания CD3 на их поверхности с использованием биспецифичного антитела анти- CD20 x анти-CD3 (REGN2281, см. выше) в комбинации либо с клетками HEK293, сконструированными для экспрессии человеческого CD20, либо с эндогенными экспрессирующими CD20 клетками Raji, где CD80 и CD86 подавлены с использованием технологии CRISPR (Raji/CD80- и CD86-негативные клетки). Связывание плеча CD20 REGN2281 с клетками, экспрессирующими CD20, запускает кластеризацию рецептора CD3, обеспечивая первый сигнал, необходимый для стимуляции Т-клеток. Важно отметить, что в некоторых случаях совместное культивирование первичных лейкоцитов с генетически отличными клетками приводит к несовместимости аллогенных детерминант и приводит к активации Т-клеток. Это может обеспечить достаточный первичный стимул в отсутствие экзогенного добавления биспецифичного антитела анти-CD20 x анти-CD3. Независимо от первичного стимула, чтобы обнаружить поддающееся количественной оценке высвобождение IL-2, необходима костимуляция, которая может быть обеспечена путем перекрестного связывания молекул CD28. В этом случае биспецифичное антитело CD28 (т.е. биспецифичное антитело анти- CD28 x анти-CD22) взаимодействует с CD28 на CD4⁺ Т-клетках и с CD22 на HEK293/hCD20 или RAJI/CD80- и CD86-негативных клетках и запускает активацию кластеризации CD28. Комбинированное взаимодействие TCR и CD28 приводит к усилению продукции IL-2, который высвобождается в среду для культивирования клеток. IL-2 обнаруживается и количественно определяется из клеточного супернатанта с использованием гомогенного, без промывания, набора AlphaLisa от PerkinElmer.

[00244] Ранее выделенные и замороженные CD4⁺ Т-клетки человека размораживали в день проведения анализа в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% FBS, NERES, натрия пирувата, незаменимых аминокислот и 0,01 mM BME (экстракт базальной мембраны), содержащего 50 ед./мл бензоназной нуклеазы). Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, ресуспендировали в стимулирующей среде и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунку. Клетки HEK293, сконструированные для экспрессии человеческого CD20 отдельно или в комбинации с человеческим CD22, обрабатывали 15 мкг/мл митомицина С в среде первичной стимуляции в концентрации 10×10^6 клеток/мл. Raji/CD80- и CD86-негативные клетки обрабатывали 20 мкг/мл митомицина С в среде первичной стимуляции в концентрации 10×10^6 клеток/мл. После инкубации в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂, клетки HEK293 и Raji промывали 3 раза D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли в лунки, содержащие CD4⁺ Т-клетки в конечной концентрации 1×10^4 клеток на лунку для клеток HEK293 или 5×10^4 клеток на лунку для

Raji/CD80- и CD86-негативных клеток. Затем в лунки добавляли серийно разведенные 1 : 3 биспецифичные или контрольные антитела анти-CD28 x анти-CD22 в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ в присутствии 2 нМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3) или REGN1945 (отрицательный по hIgG4 изотипический контроль, см. выше). Конечная точка 10-точечного разведения не содержала антитела к CD28. После инкубирования планшетов в течение 72 часов при 37°C, 5% CO₂ их центрифугировали для осаждения клеток и собирали 40 мкл супернатанта среды. Из него 5 мкл тестировали в анализе человеческого IL-2 AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения были получены на многоканальном ридере для планшетов Envision и были нанесены необработанные значения RFU (относительные единицы флуоресценции). Все серийные разведения были протестированы в двух повторах.

[00245] Значения EC₅₀ антител определяли путем подгонки данных к четырехпараметрическому логистическому уравнению на кривой зависимости реакции от дозы с 10 точками с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Кратность индукции рассчитывалась по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Максимальное среднее значение RFU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения RFU фона [0нМ]}}$$

Резюме результатов и выводы:

Репортерный анализ на основе люциферазы:

[00246] Способность биспецифичных антител анти-CD22 x анти-CD28 обеспечивать стимуляцию посредством CD28 на Т-клетках в отсутствие или в присутствии целевой экспрессии CD22 оценивали в биоанализе на основе репортерных клеток с использованием люциферазной активности в качестве считываемого значения.

[00247] Кривые активации показаны на Фигуре 2 (А и В), значения EC₅₀ и кратности индукции суммированы в таблицах 19 и 20 для сконструированных репортерных Т-клеток, дополнительно инкубированных с клетками HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/CD22 при постоянном присутствии 200 пМ REGN1945 (изотипический контроль hIgG4) или REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3).

[00248] Когда репортерные Т-клетки и АПК, происходящие из HEK293, обрабатывали 200 пМ REGN1945, ни одно из биспецифичных антител CD28 не демонстрировало увеличения люциферазной активности в отсутствие стимуляции TCR, независимо от линии HEK293, использованной в анализе. Повышенная активация люциферазы наблюдалась только для исходного антитела против CD28 (REGN5705) с клетками HEK293/hCD20 (2,18x) и клетками HEK293/hCD20/hCD22 (2,05x). В этой ситуации одноплечевое антитело к CD28 и контрольное антитело изотипа не вызывали люциферазного ответа (таблица 19 и Фигура 2).

[00249] Когда репортерные Т-клетки и АПК, происходящие из HEK293, обрабатывали 200 пМ REGN2281, оба биспецифичных антитела анти- CD22 x анти-CD28 (REGN5837 и REGN5838) индуцировали сильную люциферазную активность с

экспрессирующими CD22 клетками HEK293, на что указывало увеличение EC_{50} и кратность значения индукции. Одноплечевое контрольное антитело к CD28 и исходное антитело CD28 (REGN5705; см. SEQ ID NO:35/36 HCVR/LCVR) показали сходную активность на обеих линиях HEK293. Антитело изотипического контроля не вызывало люциферазного ответа в этих условиях (таблица 20 и Фигура 2).

[00250] Когда репортерные Т-клетки и Raji/CD80- и CD86-негативные клетки обрабатывали 200 пМ REGN1945, как биспецифичные антитела анти-CD22 x анти-CD28 (REGN5837 и REGN5838), так и исходное антитело к CD28 индуцировали активность люциферазы, в то время как одноплечевое контрольное антитело к CD28 и изотипический контроль не проявили активности (таблица 19 и Фигура 2).

[00251] Когда репортерные Т-клетки и Raji/CD80- и CD86-негативные клетки обрабатывали 200 пМ REGN2281, все биспецифичные антитела к CD28 (REGN5837 и REGN5838) и одноплечевое контрольное антитело к CD28, включая исходное антитело к CD28, индуцировали активность люциферазы. Значения EC_{50} можно было определить только для анти-CD22 x анти-CD28 и исходного антитела к CD28, но не для одноплечевого контроля CD28 из-за неспособности достичь уровней насыщения. С изотипическим контролем активации обнаружено не было (таблица 20 и Фигура 2).

Функциональный анализ IL-2 с применением первичных CD4⁺ Т-клеток человека:

[00252] Способность биспецифичных антител анти-CD22 x анти-CD28 обеспечивать костимуляцию посредством CD28 на Т-клетках в отсутствие или в присутствии целевой экспрессии CD22 оценивали в функциональном анализе первичных CD4⁺ Т-клеток с измерением продукции цитокина IL-2.

[00253] Кривые активации показаны на Фигуре 3 (А и В), значения EC_{50} и кратности индукции суммированы в таблице 21 для CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками в присутствии либо постоянной дозы 2 нМ REGN1945 (изотипический контроль hIgG4), либо REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3).

[00254] Из-за отсутствия достаточной стимуляции аллогенных первичных Т-клеток измеримого высвобождения IL-2 в лунках, содержащих клетки HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/CD22 с постоянными количествами REGN1945, отмечено не было (Фигура 3). Однако высвобождение IL-2 было обнаружено в лунках, содержащих Raji/CD80- и CD86-негативные клетки с постоянным количеством REGN1945, из-за значительного аллогенного ответа, обеспечивающего достаточный первичный стимул, даже в отсутствие опосредованной антителами кластеризации CD3 (Фигура 3 и таблица 21).

[00255] Измеримые уровни IL-2 были обнаружены в образцах, содержащих клетки HEK293/hCD20 или HEK293/hCD20/CD22, при добавлении постоянной дозы 2 нМ REGN2281 и исходных моноклональных антител к CD28 (REGN5705, см. выше). В отличие от двухвалентных моноклональных антител к CD28, высвобождение IL2 не было значительно усилено при добавлении биспецифичных моноклональных антител анти-CD22 x анти-CD28 в лунки, содержащие клетки HEK293/hCD20 и REGN2281. Только в

присутствии клеток HEK293/hCD20/CD22 и REGN2281 биспецифичные моноклональные антитела анти- CD22 x анти-CD28 значительно усиливают высвобождение IL-2 (Фигура 3 и таблица 22).

[00256] Таблицы 19-22 указаны ниже.

[00257] Таблица 19 представляет табулированные значения EC_{50} , максимальные значения и значения кратности индукции активности люциферазы в сконструированных Т-клетках, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или RAJI/CD80- и CD86-негативными клетками и постоянной дозой 200 пМ REGN1945 (изотипический контроль).

[00258] В таблице 20 представлены табулированные значения EC_{50} , максимальные значения и значения кратности индукции активности люциферазы в сконструированных Т-клетках, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками и постоянной дозой 200 пМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3).

[00259] В таблице 21 представлены табулированные значения EC_{50} , максимальные значения и значения кратности индукции высвобождения IL-2 из CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или RAJI/CD80- и CD86-негативными клетками, и постоянной дозой 2 нМ REGN1945 (изотипический контроль).

[00260] Таблица 22. Представлены табулированные значения EC_{50} , максимальные значения и значения кратности индукции высвобождения IL-2 из CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 или Raji/CD80- и CD86-негативными клетками и постоянной дозой 2 нМ REGN2281 (анти-CD20 x анти-CD3).

Таблица 19: EC₅₀, максимальные значения и значения кратности индукции активности люциферазы в сконструированных репортерных Т-клетках в отсутствие стимуляции TCR 200пМ REGN1945 (изотипический контроль):

Антитела	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80- и CD86-негативные		
	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU
REGN5837	НО	1,01	11860	НО	1,11	13280	1,66E-09	1,29	16020
REGN5838	НО	1,04	11980	НО	1,05	12480	2,55E-09	2,06	26500
REGN5705	6,23E-09	2,18	24980	8,45E-09	2,05	25060	7,88E-09	2,57	33180
Одноплечевое CD28	НО	1,00	11700	НО	1,05	12880	НО	1,05	13720
Изотипический контроль	НО	1,04	11180	НО	1,04	12160	НО	1,04	12540

Сокращения: НО=не определяли

Таблица 20: EC₅₀, максимальные значения и значения кратности индукции активности люциферазы в сконструированных репортерных Т-клетках в присутствии стимуляции TCR 200пМ REGN2281 (αCD20 x αCD3):

Антитела	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80- и CD86-негативные		
	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RLU
REGN5837	НВ	1,40	250140	6,44E-10	8,46	799220	1,43E-09	4,46	754820
REGN5838	НВ	1,65	256380	1,89E-09	4,53	398720	1,33E-09	11,02	1725640

REGN5705	2,63E-10	3,55	408680	7,7E-11	2,06	171300	4,33E-10	4,15	568740
Однопле- чевое CD28	НВ	3,56	454560	1,29E-08	2,82	228840	НВ	4,46	642220
Изотипи- ческий контроль	НО	1,09	212580	НО	1,08	103940	НО	1,05	175540

Сокращения: НВ=не вычисляемый (обозначено для кривых, в которых связывание не достигло насыщения); НО=не определяли

Таблица 21: EC₅₀, максимальные значения и значения кратности индукции высвобождения IL-2 из первичных CD4⁺ Т-клеток человека в присутствии 2нМ REGN1945 (изотипический контроль).

Антитела	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80- и CD86-негативные		
	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RFU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RFU	EC ₅₀ [М]	Кратность индукции	Макс. RFU
REGN5837	НО	1,07	2,01E+03	НО	1,00	1,74E+03	6,31E-11	5,07	6,18E+04
REGN5838	НО	1,24	2,22E+03	НО	1,00	1,89E+03	4,23E-10	3,05	5,38E+04
REGN5705	НО	1,11	2,29E+03	НО	1,71	2,95E+03	1,11E-10	3,56	4,95E+04
Одноплече-вое CD28	НО	1,32	1,76E+03	НО	1,91	2,27E+03	НВ	2,43	4,35E+04
Изотипичес-кий контроль	НО	1,19	2,29E+03	НО	1,47	1,87E+03	НО	1,00	1,51E+04

Сокращения: НВ=не вычисляемый (обозначено для кривых, в которых связывание не достигло насыщения); НО=не определяли

Таблица 22: EC₅₀, максимальные значения и значения кратности индукции высвобождения IL-2 из первичных CD4⁺ Т-клеток человека в присутствии 2нМ REGN2281 (αCD20 x αCD3).

Антитела	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80- и CD86-негативные		
	EC50 [М]	Кратность индукции	Макс. RFU	EC50 [М]	Кратность индукции	Макс. RFU	EC50 [М]	Кратность индукции	Макс. RFU
REGN5837	НВ	4,68	1,21E+04	2,35E-10	55,61	1,01E+05	4,66E-11	5,11	2,40E+05
REGN5838	НВ	6,82	1,31E+04	6,85E-10	53,73	9,63E+04	8,93E-11	6,32	2,54E+05

REGN5705	2,23E-09	30,80	6,89E+04	4,07E-09	32,24	5,74E+04	4,51E-11	6,15	2,49E+05
Одноплечевое CD28	НВ	19,45	3,99E+04	НВ	6,85	1,89E+04	НВ	4,45	1,79E+05
Изотипический контроль	НО	1,22	2,22E+03	НО	1,00	3,20E+03	НО	1,00	4,54E+04

Сокращения: НВ=не вычисляемый (обозначено для кривых, в которых связывание не достигло насыщения); НО=не определяли

Пример 10: Влияние комбинации антитела анти-CD22 X анти-CD28 плюс цемиплимаб на высвобождение ИЛ-2 из клеток, сконструированных для экспрессии PD-L1

Материалы и способы

Конструирование АПК:

Клетки RAJI

[00261] RAJI представляет собой линию клеток В-лимфоцитов, выделенную от 11-летнего мальчика в (ATCC® CCL-86™). RAJI поддерживаются в RPMI+10%FBS+И/С/Г+натрия пируват+HEPES.

RAJI CD80- и CD86-негативные

[00262] Экспрессия CD80 и CD86 в клетках RAJI была устранена с использованием системы CRISPR/Cas9.

NALM6 клон G5

[00263] Клон NALM6 представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL), выделенную от 19-летнего мужчины в [NALM6 клон G5 (ATCC, # CRL-3273)]. Клетки NALM6 поддерживаются в RPMI+10% FBS+И/С/Г.

WSU-DLCL2

[00264] [WSU-DLCL2 представляет собой линию клеток DLBCL человека, выделенную из плеврального выпота 41-летнего мужчины европеоидной расы (Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575).

Сконструированные клеточные линии PD-L1

[00265] Клеточные линии NALM-6, RAJI CD80- и CD86-негативные (RAJI/CD80-CD86-) и WSU-DLCL2 были генетически сконструированы для стабильной экспрессии человеческого PD-L1 (аминокислоты M1-T290 с номером доступа NP_054862.1). Полученные клеточные линии NALM6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1 и WSU-DLCL2/PD-L1 поддерживались в соответствующих средах с добавлением 0,5 мкг/мл пурамицина для RAJI/CD80-CD86- и 1 мкг/мл пурамицина для клеток NALM-6/PD-L1 и WSU-DLCL2/PD-L1.

Анализ активации Т-клеток для пролиферации Т-клеток и высвобождения ИЛ-2

[00266] Влияние REGN5837 на высвобождение ИЛ-2 оценивали с использованием первичных Т-клеток человека и аллогенных клеточных линий В-клеточной лимфомы человека [NALM-6, NALM-6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1, WSU-DLCL2, WSU-DLCL2/PD-L1]) в присутствии фиксированной концентрации цемиплимаба. Совместное культивирование первичных лейкоцитов с генетически отличными клетками приводит к несовместимости аллогенных детерминант и может привести к активации Т-клеток. Для анализов с использованием клеток NALM-6 и RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) анализы активации Т-клеток проводили с использованием обогащенных первичных Т-клеток человека от 3 доноров, в то время как для анализов с использованием клеток WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) применяли Т-клетки от 1 донора.

Выделение Т-клеток, используемых в анализах активации Т-клеток, для

тестирования комбинированного лечения REGN5837+REGN2810.

[00267] Для экспериментов с использованием клеток NALM-6 и RAJI/CD80-CD86-CD3+ Т-клетки были выделены из 3 донорских МКПК (555109, 555130 и 555131), тогда как МКПК от одного донора (555175) были использованы для анализов с клетками WSU-DLCL2. Для донора 555109 МКПК выделяли из периферической крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Вкратце, 15 мл Ficoll-Paque PLUS добавляют в конические пробирки объемом 50 мл, а затем поверх настилают 30 мл крови, разбавленной 1 : 1 PBS, содержащим 2% FBS. После 30-минутного центрифугирования при 400 x g с выключенным тормозом слой мононуклеарных клеток переносят в свежую пробирку, разбавляют в 5 раз PBS, содержащим 2% FBS, и центрифугируют в течение 8 минут при 300 x g. Для доноров 555130, 555131 и 555175 МКПК выделяли из периферической крови здоровых доноров с использованием набора EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit от Stem Cell Technologies и в соответствии с протоколом производителя. Выделенные МКПК замораживали в FBS, содержащем 10% ДМСО. Для выделения CD3+ Т-клеток замороженные флаконы с МКПК размораживали на водяной бане при 37°C и разводили в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% FBS, HEPES, пирувата натрия, незаменимых аминокислот и 0,01 мМ BME), содержащей 50 Ед/мл бензоназой нуклеазы. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут, ресуспендировали в буфере EasySep и выделяли с помощью набора StemCell Technologies EasySep T-Cell Isolation, следуя протоколу производителя.

Высвобождение IL-2 из первичных CD3+ Т-клеток, обработанных антителами к CD28:

Анализ активации Т-клеток с человеческими клетками OVCAR-3, PEO1, NALM-6, RAJI/CD80-CD86- и клетками WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)

[00268] CD3+ Т-клетки, ресуспендированные в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% FBS, HEPES, пирувата натрия, незаменимых аминокислот и 0,01 мМ BME), высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунку. Клетки NALM-6, RAJI/CD80-CD86-, WSU-DLCL2 с PD-L1 или без него (+/- PD-L1) обрабатывали либо 20 мкг/мл (RAJI), либо 15 мкг/мл (NALM-6 и WSU-DLCL2) митомицина С для остановки пролиферации. После инкубации в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂ обработанные митомицином С клетки промывали 3 раза D-PBS, содержащим 2% FBS, с последующим ресуспендированием в стимулирующей среде. Клетки NALM-6, RAJI/CD80-CD86- и WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) добавляли в лунки, содержащие CD3+ Т-клетки, в конечной концентрации $2,5 \times 10^4$ клеток/лунку для клеток RAJI и WSU-DLCL2 и 5×10^4 для клеток NALM-6. В лунки добавляли постоянную концентрацию цемиплимаба или несвязывающего контроля IgG4^P (20 нМ). В анализах с использованием клеток WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) в лунки добавляли постоянную концентрацию белатасепта (hCTLA4.hIgG1) или несвязывающего контроля IgG1 (50 нМ). Затем REGN5837 или контрольное антитело, не относящееся к ТААхCD28, титровали от 3,1 пМ до 200 нМ в серии разведений 1 : 4 для клеток NALM-6 (+/- PD-L1) и

от 0,6 пМ до 1000 нМ в серии разведений 1 : 6 для клеток WSU-DLCL2 и RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) и добавляли в лунки. Конечная точка кривой концентрации из 10 точек не содержала антитела REGN5837 или контроля, не относящегося к TAAxCD28. После инкубации планшетов в течение 72 часов (WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)) или 96 часов (NALM-6 и RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1)) при 37°C, 5% CO₂, отбирали по 50 мкл среды супернатанта для измерения высвобождения IL-2.

[00269] 5 мкл супернатанта тестировали на высвобождение IL-2 с использованием набора человеческого IL-2 AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения IL-2 были получены с помощью ридера для планшетов Envision от Perkin Elmer. Была включена стандартная кривая известных концентраций IL-2, которую использовали для получения значений пг/мл.

[00270] Все серийные разведения тестировали на высвобождение IL-2 в трех повторах. Значения EC₅₀ для антител определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой зависимости реакции от дозы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Максимальные уровни высвобождения IL-2 представлены как средний максимальный ответ, обнаруженный в пределах испытанного диапазона доз. Кроме того, данные, представленные для анализов с использованием клеток WSU-DLCL2, включают значения IL-2, полученные в отсутствие или в присутствии 1000 нМ титрованного антитела с тем, чтобы зафиксировать снижение уровня IL-2, наблюдаемое при увеличении концентрации антитела, отличного от TAAxCD28.

Резюме результатов и выводы:

Функциональный анализ IL-2 с применением первичных CD3+ Т-клеток человека:

[00271] Способность биспецифичных антител анти-CD22 x анти-CD28 обеспечивать костимуляцию посредством CD28 на Т-клетках в присутствии клеточных линий В-клеточных лимфоцитов, которые эндогенно экспрессируют CD22, оценивали в функциональном анализе, определяющем продуцирование цитокинов IL-2 первичными CD3+ Т-клетками человека.

[00272] Кривые активации показаны на Фигурах 5А и 5В для Т-клеток, инкубированных с NALM-6 (+/- PD-L1) (Фигура 5А) или RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) (Фигура 5В). Значения EC₅₀ и максимума IL-2 суммированы в таблице 23А для CD3+ Т-клеток, инкубированных с клетками NALM-6 (+/- PD-L1), и в таблице 23В для CD3+ Т-клеток, инкубированных с RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) в присутствии либо постоянной дозы 20нМ изотипического контроля hIgG4^P, либо цемиплимаба. Для CD3+ Т-клеток, инкубированных с клетками WSU-DLCL2 (+/- PD-L1), кривые активации показаны на Фигуре 4. Значения EC₅₀ и IL-2 (представленные для 0нМ или 1000нМ REGN5837 или антитела, отличного от TAAxCD28) суммированы в таблице 24 для Т-клеток, инкубированных с клетками WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) в присутствии или постоянной дозы 20нМ изотипического контроля hIgG4^P или цемиплимаба, и в присутствии или постоянной дозы 50нМ изотипического контроля hIgG1 или рецептора CTLA-4, белатасепта.

[00273] В присутствии первичных Т-клеток человека и клеточных линий аллогенных В-лимфоцитов RAJI/CD80-CD86- и NALM-6, REGN5837 опосредовано, зависимым от концентрации образом увеличивает высвобождение IL-2. Контрольное антитело, не относящееся к TAAxCD28, незначительно увеличивает уровень IL-2 при высоких концентрациях антитела. В отсутствие PD-L1 на клетках RAJI/CD80-CD86- или NALM-6 добавление 20нМ цемиплимаба не влияет на высвобождение IL-2. В присутствии клеток RAJI/CD80-CD86- или NALM-6, экспрессирующих PD-L1, максимальное высвобождение IL-2 в ответ на обработку одним только REGN5837 снижается по сравнению с Т-клетками, инкубированными с клетками, не экспрессирующими PD-L1. Добавление цемиплимаба минимально усиливает опосредованное REGN5837 высвобождение IL-2 в условиях с клетками NALM-6/PD-L1, тогда как оно значительно усиливает высвобождение IL-2 в присутствии клеток RAJI/CD80-CD86-/PD-L1 до уровней, наблюдаемых в условиях с клетками RAJI/CD80-CD86-, лишенными PD-L1.

[00274] В присутствии первичных Т-клеток человека и линии клеток аллогенных В-лимфоцитов WSU-DLCL2 не наблюдалось зависящего от концентрации увеличения высвобождения IL-2. Контрольное антитело, не относящееся к TAAxCD28, наоборот, снижало высвобождение IL-2 в зависимости от концентрации. В отличие от клеток NALM-6 и RAJI/CD80-CD86-, которые почти не экспрессируют или вообще не экспрессируют лиганды CD28, линия клеток WSU-DLCL2, как известно, экспрессирует лиганды CD28. Поскольку плечо связывания CD28 REGN5837 и, следовательно, плечо CD28 антитела, не относящегося к TAAxCD28, как известно, конкурирует с лигандами CD28 за связывание с CD28, контрольное антитело, не относящееся к TAAxCD28, блокирует активацию CD28 лигандом CD28, экспрессируемым на клетках WSU-DLCL2, что приводит к снижению высвобождения IL-2. В отличие от контроля, не относящегося к TAAxCD28, уровень IL-2 не снижается под действием REGN5837 из-за его способности прикрепляться к клеткам WSU-DLCL2 через плечо связывания CD22, что позволяет ему вести себя аналогично лигандам CD28, по существу заменяя их. В присутствии клеток WSU-DLCL2/PD-L1 исходное высвобождение IL-2 снижается по сравнению с клетками WSU-DLCL2, не экспрессирующими PD-L1. Добавление одного только REGN5837 в отсутствие цемиплимаба приводит к небольшому усилению высвобождения IL-2. При добавлении 20нМ цемиплимаба исходная активность усиливается и может быть немного усилена титрованием дозы REGN5837, что увеличивает максимальное высвобождение IL-2 для комбинации REGN5837 и цемиплимаба по сравнению с любой отдельной обработкой. Как наблюдалось с клетками WSU-DLCL2, инкубация клеток WSU-DLCL2/PD-L1 в присутствии антитела, отличного от TAAxCD28, приводит к снижению уровней IL-2, независимо от того, присутствует ли цемиплимаб или изотипический контроль hIgG4^P. Для дальнейшего изучения влияния экспрессии лиганда CD28 на маскировку воздействия REGN5837 растворимый рецептор CTLA-4 белатасепт или hIgG1-совместимый изотипический контроль добавляли в концентрации 50 нМ. Белатасепт с высокой аффинностью связывается с лигандами CD28, CD80 и CD86 и блокирует их взаимодействие

и, следовательно, активацию CD28. В присутствии 50нМ белатасепта исходное высвобождение IL-2 резко снижается из-за неспособности лигандов CD28 связывать CD28 и обеспечивать костимулирующую передачу сигналов. В этих условиях REGN5837 все еще способен взаимодействовать с CD28 и обеспечивать костимуляцию, на что указывает дозозависимое усиление высвобождения IL-2. Хотя добавление 20нМ цемиплимаба само по себе не увеличивает высвобождение IL-2 в присутствии белатасепта, комбинация цемиплимаба с увеличивающимися дозами REGN5837 увеличивает максимальное высвобождение IL-2 по сравнению с одним только REGN5837 в присутствии клеток, сконструированных для сверхэкспрессии PD-L1.

Таблица 23А: Комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках NALM-6, сконструированных для экспрессии PD-L1

Первичные Т-клетки+NALM-6 (+/- PD-L1)				Макс. [пг/мл]	EC ₅₀ [М]
Т-клетки донора 555109	NALM-6	REGN5837	Цемиплимаб	199,50	8,22E-10
			hlgG4 ^P	217,80	7,54E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	21,71	НО
			hlgG4 ^P	24,74	НО
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	68,34	7,42E-10
			hlgG4 ^P	40,26	6,70E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	10,07	НО
			hlgG4 ^P	11,80	НО
Т-клетки донора 555130	NALM-6	REGN5837	Цемиплимаб	281,00	8,31E-10
			hlgG4 ^P	261,30	7,18E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	27,51	НО
			hlgG4 ^P	25,18	НО
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	123,20	7,50E-10
			hlgG4 ^P	75,29	8,72E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	10,29	НО
			hlgG4 ^P	3,31	НО
Т-клетки донора 555131	NALM-6	REGN5837	Цемиплимаб	294,20	9,96E-10
			hlgG4 ^P	264,90	1,05E-09
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	21,13	НО
			hlgG4 ^P	25,45	НО
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	90,17	8,57E-10
			hlgG4 ^P	50,99	8,95E-10

		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	11,35	НО
			hlgG4 ^P	6,57	НО

НО: Не определяли из-за отсутствия наблюдаемого ответа, зависящего от концентрации.

Таблица 23В: Комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках RAJI/CD80⁻CD86⁻, сконструированных для экспрессии PD-L1

Первичные Т-клетки+RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻ (+/- PD-L1)				Макс. [пг/мл]	EC ₅₀ [M]
Т-клетки донора 555109	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻	REGN5837	Цемиплимаб	1258,00	1,41E-10
			hlgG4 ^P	1149,00	1,28E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	503,70	НР
			hlgG4 ^P	454,90	9,49E-08
	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻ / PD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	910,70	1,97E-10
			hlgG4 ^P	230,60	3,86E-11
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	518,80	НР
			hlgG4 ^P	84,41	8,20E-08
Т-клетки донора 555130	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻	REGN5837	Цемиплимаб	791,90	9,31E-11
			hlgG4 ^P	711,60	5,04E-11
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	489,70	НР
			hlgG4 ^P	370,00	НР
	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻ / PD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	664,30	6,15E-11
			hlgG4 ^P	182,10	5,24E-11
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	426,80	НР
			hlgG4 ^P	85,29	7,24E-08
Т-клетки донора 555131	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻	REGN5837	Цемиплимаб	437,40	1,28E-10
			hlgG4 ^P	426,10	9,31E-11
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	162,20	5,97E-08
			hlgG4 ^P	156,60	7,92E-08
	RAJI/CD80 ⁻ CD86 ⁻ / PD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	406,00	3,16E-10
			hlgG4 ^P	132,40	2,58E-10
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	94,94	НР
			hlgG4 ^P	37,24	НР

НР: Не рассчитано, поскольку данные не соответствуют четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Таблица 24: Комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение ИЛ-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках WSU-DLCL2, экспрессирующих PD-L1

Первичные Т-клетки+WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)				ИЛ-2 при 100нМ [пг/мл]	ИЛ-2 при 0нМ [пг/мл]	EC ₅₀ [М]	IC ₅₀ [М]	
Т-клетки донора 555175	WSU- DLCL2	REGN5837	Цемиплимаб	2276,35	3217,6 9		НО	
			hlgG4 ^P	2284,28	2482,5 4		НО	
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	609,01	3299,3 8		4,81E -09	
			hlgG4 ^P	616,95	3552,8 6		8,54E -09	
	WSU- DLCL2/ PD-L1	REGN5837	Цемиплимаб	723,06	642,64	HP		
			hlgG4 ^P	209,84	124,81	1,39E -12		
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	66,17	444,51		2,87E -09	
			hlgG4 ^P	15,47	82,91		HP	
	Т-клетки донора 555175+50 нМ белатасепт а	RAJI/CD8 0 ⁺ CD86 ⁻	REGN5837	Цемиплимаб	2061,29	112,64	6,95E -13	
				hlgG4 ^P	1809,89	71,65	1,45E -12	
He-ТАА x CD28			Цемиплимаб	502,33	164,55	HP		
			hlgG4 ^P	402,66	109,02	HP		
RAJI/CD8 0 ⁺ CD86/ PD-L1		REGN5837	Цемиплимаб	792,06	22,40	1,59E -12		
			hlgG4 ^P	238,23	5,19	3,39E -12		
		He-ТАА x CD28	Цемиплимаб	128,69	24,44	HP		
			hlgG4 ^P	14,49	1,72	HP		

НО: Не определяли из-за отсутствия наблюдаемого ответа, зависящего от концентрации.

НР: Не рассчитано, поскольку данные не соответствуют четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Пример 11. Противоопухолевая эффективность введения REGN5837 в присутствии и в отсутствие REGN1979

Введение

[00275] REGN5837 представляет собой биспецифичное антитело на основе IgG4 человека (бсАт), разработанное для нацеливания на В-клеточные НХЛ (например, DLBCL) путем связывания CD22⁺ В-клеток с CD28⁺ Т-клетками. «Сигнал 2», обеспечиваемый REGN5837, в комбинации с другими агентами, обеспечивающими «сигнал 1» (например, доставка сигнала посредством первичной стимуляции Т-клеток через кластеризацию TCR или CD3), такой как биспецифичное антитело CD20xCD3 (бсАт) REGN1979, может обеспечивать активацию амплифицированных Т-клеток и опосредованное Т-клетками уничтожение НХЛ В-клеток, углубляя ответ на CD20xCD3. Кроме того, REGN5837 может обеспечивать повышенную эффективность у пациентов, не отвечающих на монотерапию CD20xCD3.

[00276] В исследованиях, описанных ниже, оценивалась противоопухолевая эффективность CD22xCD28 бсАт REGN5837 в присутствии или в отсутствие субэффективной дозы CD20xCD3 бсАт (REGN1979), вводимой иммунодефицитным мышам NSG, несущим 8-дневные установленные опухоли В-клеточного лейкоза.

[00277] Вкратце, мышам (n=от 6 до 9 на группу) внутрибрюшинно (вб) прививали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека и внутривенно (вв) имплантировали через 12 дней В-клеточные лейкозные клетки человека NALM-6, которые были сконструированы для экспрессии люциферазы для получения изображений биолюминесценции (NALM-6-luc). Противоопухолевую эффективность REGN5837 при 0,04, 0,4 и 4 мг/кг в сочетании с фиксированной дозой REGN1979 0,04 мг/кг сравнивали с монотерапией REGN5837 и REGN1979 и с контрольными неперекрывающимися бсАт IgG4^{PVA}. Мыши получали дозы антител путем внутрибрюшинной (вб) инъекции через 8, 15 и 22 дня после имплантации клеток NALM-6-luc. Опухолевую нагрузку оценивали два раза в неделю на протяжении всего эксперимента.

Материалы и способы

Клеточные линии человеческого происхождения

[00278] NALM-6-luc: линия клеток NALM-6 представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза, выделенную от 19-летнего пациента мужского пола (DSMZ, cat # ACC 128); эта линия была модифицирована с помощью лентивируса EF1a-люцифераза-2A-GFP-Puro (GenTarget) для облегчения визуализации роста опухолевых клеток *in vivo*.

[00279] МКПК: МКПК человека были получены от ReachBio, Cat. # 0500-401, донор № 0180905 (эксперимент с опухолевым ростом) и 0180621 (эксперимент с сывороточными антителами).

Экспериментальный дизайн

Тест-система

[00280] Во всех экспериментах использовали самок мышей NSG (возраст 8-9 недель). Всем мышам внутрибрюшинно прививали МКПК человека, а затем внутривенно имплантировали клетки В-клеточного лейкоза NALM-6-luc через 12 дней после приживления. План эксперимента подробно описан в таблице 25. Рост опухоли контролировали с помощью билюминесцентной визуализации два раза в неделю на протяжении всего исследования. Для всех экспериментов мышей содержали в помещении для животных Regeneron в стандартных условиях. Все эксперименты проводились в соответствии с руководящими принципами Институционального комитета по уходу и использованию животных в Regeneron.

Имплантация мышам NSG

[00281] Самкам мышей с иммунодефицитом NSG внутрибрюшинно вводили 4×10^7 МКПК человека. Уровни Т-клеток проверяли через 11 дней после приживления с помощью ретроорбитального сбора крови и оценки процента CD45⁺ клеток человека во всех живых клетках цельной крови с помощью проточной цитометрии; уровни приживления варьировали от 0,16 до 16% клеток hCD45⁺. Мышам NSG с привитыми МКПК впоследствии имплантировали клетки NALM-6-luc.

Условия культивирования NALM-6-Luc и имплантации опухоли

[00282] Клеточная линия NALM-6 была модифицирована лентивирусом EF1a-люцифераза-2A-GFP-Puro (GenTarget) для облегчения визуализации роста опухолевых клеток *in vivo*. Клеточную линию поддерживали в RPMI с 10% FBS с добавлением ПСГ (пенициллин, стрептомицин и глутамин) и при селекции пурамицином.

[00283] Клетки NALM-6-luc собирали центрифугированием и повторно суспендировали в PBS при $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. Мышам NSG вводили внутривенно 200 мкл (5×10^6 клеток) клеток NALM-6-luc на 12 день после приживления МКПК.

Дозирование антител для измерения опухоли

[00284] Перед введением дозы тестируемых препаратов или контролей мышей распределяли по группам, стратифицированным в соответствии с опухолевой нагрузкой и уровнями приживления Т-клеток. Антитела (REGN5837, REGN1979, REGN5671 [не относящийся к TAAxCD28 неперекрывающий контроль бсАт] или H4sH17664D [не относящийся к TAAxCD3 неперекрывающий контроль бсАт]) вводили в виде монотерапии или в комбинации путем внутрибрюшинной инъекции на 8, 15 и 22 дни после имплантации (для определения эффективности *in vivo*) в дозах, указанных в таблице 25.

Таблица 25: Экспериментальный дизайн для оценки опухолевого роста

Группы	Н на группу	Доза REGN5837 или не-TAAxCD28	Доза REGN1979 или не-TAAxCD3	Схема дозирования Ат (ВБ инъекция)	Дни измерения объема опухоли
REGN5837	8	4 мг/кг	0,04 мг/кг	Дни 8, 15, и	Дни 6, 10, 14,

+ REGN1979			22 после имплантации и клеток NALM-6-luc	17, 20 и 23 после имплантации
REGN5837 + REGN1979	8 ^a	0,4 мг/кг		
REGN5837 + REGN1979	9	0,04 мг/кг		
REGN5837 + He-TAAxCD3	8 ^a	4 мг/кг		
He- TAAxCD28+RE GN1979	8	4 мг/кг		
He-TAAxCD28 + He-TAAxCD3	9 ^a	4 мг/кг		

^a Одна мышь из этой группы пала рано во время эксперимента и была исключена. Эти смертельные случаи не были связаны с опухолевым ростом и вряд ли были связаны с дозированием исследуемых препаратов, поскольку одна мышь пала в контрольной группе

Измерение опухоли и назначенная конечная точка

[00285] Мышей, которым имплантировали опухоли NALM-6-luc, визуализировали дважды в неделю с использованием прибора IVIS Spectrum, и данные анализировали с использованием программного обеспечения Living Image. Перед визуализацией мышам внутрибрюшинно вводили субстрат люциферина. Через десять минут мышей анестезировали изофлураном и количественно оценивали биолюминесценцию (общий поток, выраженный в фотонах в секунду [ф/с]). Эксперимент был завершен, когда у мышей начали проявляться признаки реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) (оцениваемой как потеря веса более чем на 20%) в соответствии со стандартами IACUC (Институционального комитета по уходу и использованию животных).

Статистический анализ опухолевого роста

[00286] Результаты определения объема опухоли во времени анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 8).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевая эффективность введения REGN5837 в присутствии и в отсутствие REGN1979

Мыши с иммунодефицитом NSG, несущие опухоли NALM-6-luc, получали внутрибрюшинные инъекции антител или неперекрывающиеся контроли, как описано выше.

[00287] У мышей с опухолью обработка 0,04, 0,4 и 4 мг/кг REGN5837 в присутствии 0,04 мг/кг REGN1979 приводила к статистически значимому подавлению роста опухоли по

сравнению с контрольными неперекрывающимися бсАт (не-ТААхCD28 и не-ТААхCD3 бсАт) на 23-и сутки после имплантации (соответственно, $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$) (Фигура 6). На 20-й день после имплантации наблюдалось значительное подавление роста опухоли для групп 0,4 и 4 мг/кг ($p < 0,05$ для обеих групп). Монотерапия ни REGN5837 (4 мг/кг), ни REGN1979 (0,04 мг/кг) достоверно не снижала рост опухоли по сравнению с контрольными неперекрывающимися бсАт. Ни одна разница между любой комбинированной дозой REGN5837+REGN1979 и монотерапией бсАт не достигла статистической значимости. Быстрый рост опухоли наблюдался при дозировании контрольных неперекрывающихся бсАт в течение всего периода дозирования, и все мыши были умерщвлены на 23 день. Во всех группах РТПХ наблюдалась по меньшей мере у одной мыши в конце эксперимента (оценивается как снижение веса более чем на 20%).

[00288] В независимом эксперименте с использованием другой группы мышей кровь собирали в следующие моменты времени для определения концентраций антител в сыворотке: 1 и 4 часа после введения дозы на 7 день, 1 час до введения дозы и 4 часа после введения дозы на дни 14 и 21, и один раз в день 29. Минимальные концентрации антител в сыворотке во время периода дозирования определяли за 1 час до дозирования в дни 14 и 21. Введение REGN5837 в дозах 0,04, 0,4 и 4 мг/кг в присутствии 0,04 мг/кг REGN1979 было связано с минимальными концентрациями REGN5837 в сыворотке крови в диапазоне от ниже предела количественного определения (ПКО), соответственно, до 0,1, от 1,6 до 2,3 и от 16,5 до 21,1 мкг/мл. Минимальные концентрации REGN1979 в сыворотке были ниже ПКО во всех случаях (данные не приводятся).

ВЫВОДЫ

[00289] Дозы REGN5837 в 0,04, 0,4 и 4 мг/кг в присутствии 0,04 мг/кг REGN1979 были эффективны при подавлении роста опухоли В-клеточного лейкоза NALM-6 у мышей. Не наблюдалось значительного подавления опухоли ни при использовании 4 мг/кг REGN5837, ни при монотерапии 0,04 мг/кг REGN1979 по сравнению с контролем.

Пример 12: Костимулирующее действие биспецифичного антитела CD22хCD28 при цитотоксичности в отношении клеток CD22+ МКПК человека +/- CD22хCD28 на основе FACS (фиксированная доза CD22хCD28, титрованная доза CD20хCD3)

Метериалы и способы

[00290] Усиление при помощи CD22хCD28 целевого уничтожения, осуществляемого CD20хCD3, оценивали в 96-часовом анализе цитотоксичности, нацеленном на клетки Nalm6 или WSU-DLCL2. Вкратце, человеческие МКПК помещали в среду с добавлением RPMI в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитами за счет истощения прилипших макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки Nalm6 или WSU-DLCL2 метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CFDA-SE, а прилипшие наивные МКПК с истощенными клетками метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CellTrace Violet. Меченые клетки-мишени и МКПК (соотношение эффектор/клетка-мишень 4 : 1 для Nalm6, 5 : 1 для WSU-DLCL2) совместно

инкубировали с серийными разведениями биспецифичного антитела CD20xCD3 REGN1979 (диапазон концентраций: от 5 нМ до 0,64 пМ) с или без фиксированной концентрации CD22xCD28 REGN5837 в 2,5 мкг/мл (16,7 нМ). В анализе, нацеленном на клетки Nalm6, добавляли постоянное количество антитела CD22xCD28 REGN5838, одноплечевого биспецифичного контроля CD28 (REGN5678) или изотипического контроля IgG4s (H4sH10154P3) в концентрации 2,5 мкг/мл (16,7 нМ). После инкубации в течение 96 часов при 37°C клетки собирали с планшетов и анализировали с помощью FACS на FACS BD LSRFortessa-X20. Для анализа FACS клетки окрашивали реактивным красителем Fixable Live/Dead Far Red (Invitrogen). В каждую лунку непосредственно перед анализом FACS добавляли 20000 счетных шариков, и для каждого образца собирали 10000 шариков. Для оценки специфичности уничтожения клетки отбирали в живых популяциях, меченных CFDA-SE. Процент или количество живых клеток-мишеней регистрировали и использовали для расчета выживаемости.

[00291] Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD4, CD8 и CD25. Как мера активации Т-клеток служил процент клеток CD8+, экспрессирующих CD25. Кроме того, по мере пролиферации Т-клеток CellTraceViolet разбавляется, что приводит к более низкому MFI, измеренному с помощью FACS. Таким образом, о пролиферации Т-клеток сообщалось как об уменьшении MFI CellTraceViolet на CD8+ Т-клетках или как о процентном отношении CD8+ клеток, у которых был снижен MFI CellTraceViolet.

[00292] Супернатанты от этого анализа собирали для анализа уровней цитокинов. Концентрации IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 и IL-2 анализировали с использованием набора Cytometric Bead Array (CBA) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни цитокинов были интерполированы из кривых, построенных по стандартам набора, и представлены в пг/мл. Значения EC₅₀ для уничтожения клеток-мишеней, активации Т-клеток, пролиферации и уровней цитокинов, а также максимальные уровни цитокинов были рассчитаны с использованием четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа в программе Prism.

Результаты, резюме и выводы:

[00293] Анти-CD20xCD3 биспецифичное антитело REGN1979 было протестировано на способность индуцировать наивные человеческие Т-клетки для уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих человеческие CD20 и CD22 в комбинации с костимулирующим антителом CD22xCD28 или одноплечевым антителом против CD28 или антителами изотипического контроля.

[00294] Антитело REGN1979 активировало и направляло Т-клетки человека на уничтожение клеток Nalm6 (Фигура 7) или WSU-DLCL2 (Фигура 8) дозозависимым образом. Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало цитотоксическую эффективность (EC₅₀) REGN1979 против клеток Nalm6 в 4,7-5,2 раза по сравнению с REGN1979 с одноплечевым антителом против CD28 или контрольными изотипическими антителами (таблица 26), или в 17,5 раз в отношении

клеток против WSU-DLCL2 по сравнению с одним только REGN1979 (таблица 27).

[00295] Наблюдаемый лизис клеток-мишеней, опосредованный REGN1979, был связан с активацией и пролиферацией Т-клеток, как было измерено с помощью, соответственно, позитивной регуляции CD25 на CD8+ клетках или фиолетового разведения CellTrace (Фигура 7, Фигура 8). Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало эффективность активации и пролиферации Т-клеток, индуцированных REGN1979 в присутствии клеток Nalm6, в, соответственно, 2,3-2,6 раза и 5,4-7,1 раза по сравнению с REGN1979 с одноплечевым антителом против CD28 или изотипическими контрольными антителами (таблица 26), или в 8,2 и 16,1 раза в присутствии клеток WSU-DLCL2 по сравнению с одним только REGN1979 (таблица 27).

[00296] В анализах с человеческими клетками МКПК и WSU-DLCL2, REGN1979 индуцировало высвобождение человеческих цитокинов. Высвобождение цитокинов, наблюдаемое с REGN1979, увеличивалось в присутствии фиксированной концентрации CD22xCD28 по сравнению с высвобождением цитокинов, индуцированным одним только REGN1979 (таблица 28, Фигура 9).

[00297] Таким образом, костимуляция увеличивала эффективность направленной цитотоксичности, активации Т-клеток и высвобождения цитокинов по сравнению с тем, что наблюдалось с одним только CD20xCD3 или в сочетании CD20xCD3 с контрольными антителами.

Табулированная сводка данных:

Таблица 26: Значения EC50 для цитотоксичности и активации Т-клеток с мишенями Nalm6 (1 эксперимент)

Антитело	Гибель клеток		Активация Т-клеток (CD8+/CD25+)		Пролиферация Т-клеток (CellTrace MFI клеток CD8+)	
	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с IgG4s	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с IgG4s	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с IgG4s
REGN5837	3,89E-11	4,7	4,05E-11	2,3	3,83E-11	5,4
REGN5838	3,57E-11	5,2	3,60E-11	2,6	2,87E-11	7,1
1-плечевое CD28	1,88E-10	1,0	9,20E-11	1,0	1,97E-10	1,0
Изотипический контроль IgG4s	1,84E-10	1,0	9,28E-11	1,0	2,05E-10	1,0

Таблица 27: Значения EC50 для цитотоксичности и активации Т-клеток с

мишенями WSU-DLCL2 (среднее из 2 экспериментов)

Антитело	Гибель клеток		Активация Т-клеток (CD8+/CD25+)		Пролиферация Т-клеток (% от CD8)	
	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с одним только REGN1979	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с одним только REGN1979	EC50 [M]	Кратность EC50 по сравнению с одним только REGN1979
REGN5837	1,39E-13	17,5	1,28E-12	8,2	7,10E-13	16,1
Без антител	2,33E-12	1,0	1,22E-11	1,0	1,23E-11	1,0

Таблица 28: Высвобождение цитокинов по данным анализа цитотоксичности с WSU-DLCL2 (среднее из 2 экспериментов)

		REGN5837	нет антител
IL-2	EC50	1,82E-11	5,85E-10
	Макс. (пг/мл)	3022	564
	Кратность (макс.)	6,4	1,0
IL-4	EC50	1,24E-11	8,69E-11
	Макс. (пг/мл)	65,035	34,855
	Кратность (макс.)	1,9	1,0
IL-6	EC50	2,31E-11	8,66E-11
	Макс. (пг/мл)	194,36	116,085
	Кратность (макс.)	1,8	1,0
IL-10	EC50	1,35E-10	1,30E-10
	Макс. (пг/мл)	686,15	520,7
	Кратность (макс.)	1,3	1,0
TNF α	EC50	3,84E-11	2,09E-10
	Макс. (пг/мл)	327,85	84,55
	Кратность (макс.)	4,1	1,0
IFN γ	EC50	1,06E-10	2,78E-10
	Макс. (пг/мл)	470,7	195,5
	Кратность (макс.)	2,4	1,0
IL-17a	EC50	2,56E-10	2,74E-10

Макс. (пг/мл)	19,775	15,091
Кратность (макс.)	1,4	1,0

Пример 13: Стимулирующее действие CD22xCD28 при цитотоксичности в отношении клеток НХЛ+МКПК человека +/- CD22xCD28 на основе FACS (фиксированная доза CD22xCD28, титрованная доза CD20xCD3)

Методика эксперимента

[00298] Усиление при помощи CD22xCD28 целевого уничтожения осуществляемого CD20xCD3, оценивали в 96-часовом анализе цитотоксичности, нацеленном на клетки НХЛ, выделенные из первичной биопсии пациента с НХЛ, с аутологичными МКПК в присутствии стромальных клеток человека (HS-5). Вкратце, клетки HS-5 высевали по 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном и инкубировали в течение ночи. На следующий день МКПК от пациента с НХЛ метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CellTrace Violet. Костный мозг и меченые МКПК (соотношение эффектор/клетка-мишень 10 : 1) помещали в лунки со стромальными клетками и инкубировали совместно с серийным разведением биспецифичного антитела CD20xCD3 REGN1979 (диапазон концентраций: от 6,7 нМ до 10,7 пМ) и фиксированной концентрацией костимулирующих молекул CD22xCD28 REGN5837 или одноплечевого биспецифичного контроля CD28 (REGN5678) при 2,5 мкг/мл (16,7 нМ) в течение 96 часов при 37°C. Клетки собирали с планшетов и анализировали с помощью FACS на FACS BD LSRFortessa-X20. Для анализа FACS клетки окрашивали коктейлем антител (CD45, CD19, CD4, CD8, CD25) и фиксирующим жизнеспособность активным красителем в ближнем ИК-диапазоне Fixable Live/Dead near IR reactive dye (Invitrogen). 20000 счетных шариков добавляли в каждую лунку непосредственно перед анализом FACS, и для каждого образца собирали 10000 шариков. Для оценки специфичности уничтожения клетки-мишени вводили в живую CD45+, отрицательную по фиолетовому окрашиванию популяцию клеток CD19+. Выживаемость рассчитывалась на основе количества клеток-мишеней в обработанной лунке, нормированного по отношению к количеству клеток-мишеней в необработанных лунках.

[00299] Т-клетки определялись как живые CD45+ фиолетовые популяции CD4+ или CD8+. Процент CD8+ и CD4+ клеток, экспрессирующих CD25, был представлен как мера активации Т-клеток. Кроме того, по мере пролиферации Т-клеток CellTraceViolet разбавляется, что приводит к более низкому MFI, измеренному с помощью FACS. Таким образом, о пролиферации Т-клеток сообщалось как о снижении MFI CellTraceViolet на Т-клетках CD8+ и CD4+.

[00300] Значения EC50 для уничтожения мишеней и активации и пролиферации Т-клеток рассчитывали с использованием четырехпараметрического нелинейного регрессионного анализа в программе Prism.

Резюме результатов и выводы:

[00301] Биспецифичное антитело против CD20xCD3 REGN1979 было протестировано на способность индуцировать наивные аутологичные Т-клетки для

уничтожения клеток НХЛ из костного мозга пациента в комбинации с костимулирующим антителом CD22xCD28 или контрольными одноплечевыми антителами против CD28.

[00302] REGN1979 активировал и направлял человеческие Т-клетки на истощение НХЛ дозозависимым образом. Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало цитотоксическую эффективность (EC50) REGN1979 в 2,3 и 3,5 раза по сравнению с REGN1979 с одноплечевым контрольным антителом к CD28 или без контроля костимуляции (таблица 29).

[00303] Наблюдаемый лизис клеток-мишеней, опосредованный REGN1979, был связан с активацией и пролиферацией Т-клеток, что измерялось, соответственно, по положительной регуляции CD25 на клетках CD8⁺ и CD4⁺ клетках или по разведению CellTrace violet. Добавление фиксированной концентрации биспецифичных антител CD22xCD28 к REGN1979 увеличивало эффективность активации и пролиферации Т-клеток, индуцированных REGN1979, соответственно, в 2,8-4,2 раза и 2,8-4,8 раз по сравнению с REGN1979 с одноплечевым контролем CD28 или без контроля костимуляции (таблица 29 и Фигура 10).

[00304] Таким образом, костимуляция увеличивала эффективность направленной цитотоксичности и активации Т-клеток по сравнению с тем, что наблюдалось с CD20xCD3 в сочетании с контрольными антителами.

Табулированное резюме данных:

Таблица 29: Значения EC50 для цитотоксичности и активации Т-клеток

Антитело	Гибель клеток EC50 [M]	Активация Т-клеток (CD25+) EC50 [M]		Пролиферация Т-клеток (CellTrace MFI Т-клеток) EC50 [M]	
		CD8 Т-клетки	CD4 Т-клетки	CD8 Т- клетки	CD4 Т- клетки
REGN5837	7,81E-12	1,35E-11	6,96E-12	1,52E-11	8,54E-12
Одноплечевое CD28	1,80E-11	4,01E-11	2,95E-11	4,71E-11	4,13E-11
Без костимуляции	2,72E-11	3,77E-11	2,74E-11	4,27E-11	3,93E-11

Пример 14. Характеристика *In vitro* и оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности одного только REGN5837 и в сочетании с REGN1979 на модели диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL)

Материалы и методики - Введение в исследование и резюме результатов

Исследования *in vitro* и *in vivo* проводились, чтобы оценить:

[00305] (1) способность REGN5837 усиливать активацию первичных Т-клеток путем связывания CD28⁺ Т-клеток с клетками-мишенями CD22⁺. Активацию Т-клеток оценивали с использованием цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, экспрессии маркеров

активации Т-клеток на клеточной поверхности, пролиферации Т-клеток и уровней высвобождения цитокинов в качестве считываемых данных. Эксперименты проводились в присутствии или в отсутствие REGN1979, бсАт против CD20хCD3, которое связывает молекулы CD3 с Т-клетками и клетками-мишенями CD20+ и приводит к активации Т-клеток.

[00306] (2) противоопухолевую эффективность бсАт против CD22хCD28, REGN5837 в присутствии или в отсутствие 0,4 или 4 мг/кг REGN1979, вводимого иммунодефицитным мышам NSG, несущим опухоли DLBCL.

[00307] REGN5837 и REGN1979 были протестированы в комбинации в диапазоне концентраций, чтобы оценить влияние REGN5837 на опосредованную REGN1979 цитотоксичность Т-клеток в отношении линии клеток DLBCL человека (WSU-DLCL2), повышающую регуляцию маркера поздней активации Т-клеток (CD25), пролиферацию Т-клеток и высвобождение цитокинов из первичных Т-клеток человека. REGN5837 усиливал эффективность REGN1979 в опосредовании цитотоксичности Т-клеток, экспрессии CD25 на поверхности Т-клеток CD4+ и CD8+ и пролиферации Т-клеток CD4+ и CD8+ в зависимости от концентрации. Аналогичным образом, REGN5837 увеличивал эффективность REGN1979 в опосредовании высвобождения цитокинов в зависимости от концентрации. В диапазоне концентраций от 77,2 пМ до 100 нМ REGN5837 увеличивал эффективность опосредованной REGN1979 цитотоксичности Т-клеток в отношении клеток-мишеней; в диапазоне концентраций от 77,2 пМ до 2,78 нМ, REGN5837 увеличивал эффективность активации и пролиферации Т-клеток, опосредованных REGN1979, но более высокие концентрации REGN5837 не увеличивали в дальнейшем эффективность REGN1979 (таблица 30). Максимальное количество опосредованного REGN1979 уничтожения клеток-мишеней и пролиферации Т-клеток существенно не увеличивалось при добавлении REGN5837, тогда как REGN5837 увеличивал максимальные уровни опосредованного REGN1979 высвобождения IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ и IL-17 α в зависимости от концентрации.

[00308] Иммунодефицитным мышам NSG (n=от 6 до 7 на группу) подкожно (ПК) имплантировали клетки WSU-DLCL2 и человеческие МКПК в соотношении 1 : 1. Противоопухолевую эффективность REGN5837 в дозе 1 мг/кг в комбинации с дозой REGN1979 0,4 или 4 мг/кг сравнивали с монотерапией REGN5837 и REGN1979 и с контрольными неперекрывающимися бсАт IgG4^{P-PVA}. Мыши получали дозы антител путем внутрибрюшинной (ВБ) инъекции через 1, 8 и 15 дней после имплантации клеток WSU-DLCL2. К 28 дню после имплантации обработка 1 мг/кг REGN5837 в присутствии 0,4 или 4 мг/кг REGN1979 приводила к статистически значимому подавлению роста опухоли WSU-DLCL2 по сравнению с монотерапией REGN5837 или REGN1979 и неперекрывающимися контрольными бсАт. Монотерапия REGN1979 приводила к умеренному подавлению роста опухоли, тогда как монотерапия REGN5837 не имела эффекта по сравнению с неперекрывающимся контролем.

[00309] Таким образом, когда REGN5837 и REGN1979 тестировались в комбинации

в диапазоне концентраций *in vitro*, REGN5837 усиливал эффективность REGN1979 при опосредовании активации человеческих Т-клеток в присутствии клеток CD22+ WSU-DLCL2. В присутствии REGN5837 были увеличены максимальные уровни высвобождения цитокинов, опосредованные REGN1979, но не цитотоксичности, активации или пролиферации Т-клеток. *In vivo*, 1 мг/кг REGN5837 в присутствии 0,4 или 4 мг/кг REGN1979 был эффективен при подавлении роста опухоли В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2 у мышей по сравнению с одной только монотерапией REGN5837 или REGN1979.

Таблица 30: Резюме воздействия REGN5837 на активацию Т-клеток, опосредованную REGN1979 (измеренную по цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, экспрессии CD25 и пролиферации Т-клеток) с использованием МКПК человека

		Фиксированная концентрация REGN5837						
		1,00× 10 ⁻⁷	1,67× 10 ⁻⁸	2,78× 10 ⁻⁹	4,63× 10 ⁻¹⁰	7,72× 10 ⁻¹¹	0	
WSU- DLCL2 Гибель клеток	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	8,53× 10 ⁻¹⁴	1,85× 10 ⁻¹³	3,98x 10 ⁻¹³	3,46× 10 ⁻¹³	8,37× 10 ⁻¹³	2,89×10 ⁻¹²	
	Макс. % токсичности	81,5	79,8	80,6	87,5	82,1	83,2	
	Кратность изменения (EC ₅₀) ^b	33,9	15,7	7,3	8,3	3,5	1,0	
Активаци- ция CD4 ⁺ Т- клеток (% CD25 ⁺)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1,16x 10 ⁻¹³	8,70x 10 ⁻¹⁴	7,11x 10 ⁻¹⁴	1,46x 10 ⁻¹³	2,08x 10 ⁻¹³	9,17×10 ⁻¹³	
	Макс. % клеток CD25 ⁺	94,1	95,6	94,2	91,9	91,7	92,4	
	Кратность изменения (EC ₅₀)	7,9		10,5	12,9	6,3	4,4	1,0
Активаци- ция CD8 ⁺ Т-клеток (% CD25 ⁺)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	6,32×10 ⁻¹³		5,88x 10 ⁻¹³	2,68x 10 ⁻¹³	9,01x 10 ⁻¹³	1,64x 10 ⁻¹²	3,38x 10 ⁻¹²
	Макс. % клеток CD25 ⁺	89		90,9	89,7	86,2	88,4	87,1
	Кратность изменения (EC ₅₀)	5,3		5,7	12,6	3,8	2,1	1,0
Проли- ферация	REGN1979 EC ₅₀ (M)	8,42×10 ⁻¹³		9,31x 10 ⁻¹³	4,25x 10 ⁻¹³	1,25x 10 ⁻¹²	2,36x 10 ⁻¹²	1,63x 10 ⁻¹¹

CD4⁺ Т-клеток	Макс. % пролиферации	54,72	54,09	54,79	52,06	44,73	38,67
	Кратность изменения (EC₅₀)^a	19,3	17,5	38,3	13,1	6,9	1,0
Проли- ферация CD8⁺ Т-клеток	REGN1979 EC₅₀ (M)	1,55×10 ⁻¹²	8,31x 10 ⁻¹³	7,09x 10 ⁻¹³	3,43x 10 ⁻¹²	8,36x 10 ⁻¹²	1,97x 10 ⁻¹¹
	Макс. % пролиферации	59,1	58,9	60,2	56,4	53,2	51,1
	Кратность изменения (EC₅₀)^a	12,7	23,7	27,8	5,7	2,4	1,0

^a REGN1979 тестировали в диапазоне концентраций от 4.8фМ до 10нМ

^b Кратность изменения в EC₅₀ рассчитывали как EC₅₀(без REGN5837)/EC₅₀([M] REGN5837)

ПРИМЕР 15: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ REGN5837 НА АКТИВАЦИЮ Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ОПОСРЕДОВАННУЮ REGN1979, И ТЕСТИРОВАНИЕ REGN5837 И REGN1979 В КОМБИНАЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК WSU-DLCL2.

[00310] Исследования как *in vitro*, так и *in vivo* были проведены для оценки противоопухолевой эффективности человеческого бсАт CD22хCD28 REGN5837 в присутствии или в отсутствие субэффективной дозы человеческого бсАт CD20хCD3 (REGN1979) у мышей NSG после имплантации МКПК человека и клеток WSU-DLCL2 путем измерения следующих параметров: а) цитотоксичность Т-клеток в отношении клеток-мишеней CD22⁺;

б) повышающая регуляция CD25 на поверхности клеток Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, маркера активации Т-клеток; в) пролиферация Т-клеток; г) высвобождение цитокинов (IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ и IL-17A)

Материалы и способы

Клеточные линии

[00311] WSU-DLCL2: WSU-DLCL2 представляет собой линию клеток DLBCL человека, выделенную из плеврального выпота 41-летнего мужчины европеоидной расы (Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575).

МКПК человека

[00312] Для анализа цитотоксичности, активации Т-клеток, пролиферации Т-клеток и высвобождения цитокинов лейкоконцентраты от людей - доноров были получены из Нью-Йоркского центра крови (донор № 1500А).

[00313] Для экспериментов на мышах *in vivo* МКПК человека получали из ReachBio

(Cat. # 0500-401).

Экспериментальный дизайн

[00314] REGN5837 и REGN1979 были протестированы в комбинации в диапазоне концентраций для оценки влияния REGN5837 на опосредованную REGN1979 цитотоксичность Т-клеток в отношении клеток WSU-DLCL2, пролиферацию Т-клеток, экспрессию на поверхности клеток маркера поздней активации Т-клеток (CD25) и высвобождение цитокинов Т-клетками человека. Процент уничтожения клеток-мишеней, активации Т-клеток и пролиферации Т-клеток определяли, как описано в настоящем документе.

[00315] Противоопухолевую эффективность REGN5837 отдельно и в комбинации с REGN1979 на модели DLBCL с использованием клеток WSU-DLCL2 и МКПК оценивали, как описано в настоящем документе. См. таблицу 31.

Оценка *in vitro* влияния REGN5837 на способность REGN1979 опосредовать активацию Т-клеток

Выделение первичных Т-клеток человека

[00316] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) выделяли из лейкоцитарного концентрата здорового донора с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием 50 мл пробирок SepMate™ в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Вкратце, 15 мл FicollPaque PLUS наслаивали в пробирки SepMate на 50 мл с последующим добавлением 30 мл цельной крови, разведенной 1 : 2 D-PBS. Пробирки центрифугировали при комнатной температуре при 1200 x g в течение 10 минут с выключенным тормозом. Верхний слой, содержащий плазму и МКПК, декантировали в свежую пробирку. Последующие шаги выполнялись в соответствии с протоколом производителя SepMate. Выделенные МКПК замораживали в FBS, содержащем 10% ДМСО, в концентрации 250×10^6 клеток/мл в криопробирках на 5 мл. МКПК размораживали на водяной бане при 37° и ресуспендировали в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% FBS, NEPEs, пирувата натрия, незаменимых аминокислот и 0,01 мМ BME), содержащей 50 ед./мл бензоназной нуклеазы при 10 мл на 100 миллионов МКПК и центрифугировали при 300 x g в течение 10 минут. CD3+ Т-клетки выделяли из осажденных МКПК с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep™ Human CD3+ T Cell Isolation Kit от StemCell Technologies, следуя инструкциям производителя.

Анализ активации Т-клеток на основе проточной цитометрии с использованием МКПК

[00317] Способность REGN5837 усиливать активацию Т-клеток, опосредованную либо аллогенным первичным стимулом, либо «сигналом 1», обеспечиваемым REGN1979, оценивали с использованием клеток-мишеней WSU-DLCL2 и МКПК человека в качестве эффекторных клеток. МКПК были обогащены лимфоцитами, как описано здесь. Клетки-мишени и эффекторные клетки инкубировали с тестируемым изделием и контрольными антителами, как описано здесь. Проточную цитометрию выполняли для оценки

цитотоксичности Т-клеток, пролиферации и усиления маркеров активации Т-клеток, как описано в данном документе. Кроме того, влияние REGN5837 на опосредованное REGN1979 высвобождение цитокинов оценивали, как описано в данном документе. Не-ТААхCD28 бсАт (содержащий CD28-связывающее плечо, идентичное REGN5837, и несвязывающее плечо) тестировали в качестве неперекрывающегося контроля для REGN5837.

Обогащение МКПК лимфоцитами

[00318] Человеческие МКПК высевали в полные среды (среды для культивирования клеток RPMI с добавлением 10% FBS, пенициллина-стрептомицина-глутамин) при концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитов за счет истощения прилипших клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки и некоторые моноциты.

Инкубация МКПК и клеток-мишеней с тестируемыми наименованиями

[00319] Обогащенные лимфоцитами МКПК собирали и метили 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Violet Cell Tracker. Клетки-мишени WSU-DLCL2 метили 1 мкМ флуоресцентного красителя Vybrant CFDA-SE.

[00320] Затем меченые красителем МКПК высевали в 96-луночные планшеты с круглым дном и мечеными красителем клетками-мишенями в соотношении 5: 1 (WSU-DLCL2 при 5×10^3 клеток-мишеней/лунку).

[00321] Помещенные в планшеты МКПК и клетки-мишени инкубировали в течение 72 часов при 37°C с тестируемыми образцами или их соответствующими контролями при конечных концентрациях в диапазоне от 12,9 пМ до 100 нМ (REGN5837 или не-ТААхCD28) и от 4,8 фМ до 10 нМ (REGN1979 или не-ТААхCD28).

Анализ с применением проточной цитометрии

[00322] После инкубации с тестируемыми образцами и контролями меченые красителем клетки окрашивали красителем LIVE/DEAD и смесью меченых флуорофором антител к CD2, CD4, CD8 и CD25. Счетные шарики (20 мкл на лунку) добавляли непосредственно перед анализом образца на проточном цитометре BD Celesta. Данные проточной цитометрии использовали для определения выживаемости клеток-мишеней, пролиферации Т-клеток и повышения уровня маркеров активации Т-клеток. Значения EC_{50} определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 9-балльной кривой зависимости реакции от дозы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Максимальные ответы для цитотоксичности, активации Т-клеток (повышающая регуляция CD25) и пролиферации определяли как плато максимального ответа, полученное с помощью аппроксимации кривой призмы. Относительное изменение EC_{50} по сравнению с контролем рассчитывали как $EC_{50}_{\text{He REGN5837}}/EC_{50}_{[\text{M}] \text{ REGN5837}}$, и относительное изменение максимального высвобождения цитокинов рассчитывали как $Max_{[\text{M}] \text{ REGN5837}}/Max_{\text{He REGN5837}}$.

Выживаемость клеток-мишеней

[00323] Процентное содержание жизнеспособных клеток-мишеней в каждом экспериментальном состоянии рассчитывали как количество живых, меченных CFDA-SE

клеток-мишеней на лунку, нормированное на количество собранных шариков на лунку. Процент выживаемости клеток-мишеней определяли как отношение количества жизнеспособных клеток-мишеней в любых экспериментальных условиях к количеству жизнеспособных клеток-мишеней в условиях отсутствия антител (клетки-мишени в присутствии только МКПК).

[00324] Процент цитотоксичности в отношении клеток-мишеней в каждом экспериментальном состоянии, о котором сообщалось таким образом, был определен как 100 минус процент выживаемости (рассчитанный, как описано выше).

Экспрессия CD25 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺

[00325] Повышение регуляции CD25 (маркера поздних активируемых Т-клеток) оценивали путем пропускания живых, CD2⁺, а также клеток CD4⁺ или CD8⁺. Сообщалось о процентном соотношении активированных Т-клеток, экспрессирующих CD25, от общего количества Т-клеток, экспрессирующих либо CD4, либо CD8.

Пролиферация Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺

[00326] Первичную пролиферацию Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ оценивали с помощью проточной цитометрии, вычисляя процент делящихся клеток от общего количества Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Поскольку интенсивность флуоресценции каждой клетки уменьшается в 2 раза с каждым циклом деления для считывания деления клеток использовалась интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Violet Cell Tracker.

Анализ высвобождения цитокинов

[00327] Уровни цитокинов (IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ и IL-17A) в супернатантах клеточных культур количественно оценивали путем применения BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit согласно инструкции производителя.

Модель DLBCL in vivo с использованием ксенотрансплантатов клеток WSU-DLCL2

[00328] Во всех экспериментах использовали самок мышей NSG. Всем мышам подкожно имплантировали клетки В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2 и вводили внутривенно антитела. Рост опухоли измеряли штангенциркулем несколько раз в неделю на протяжении всего исследования. Для всех экспериментов мышей содержали в помещении для животных Regeneron в стандартных условиях. Все эксперименты проводились в соответствии с руководящими принципами Институционального комитета по уходу и использованию животных (IACUC) в Regeneron.

Условия культуры клеток WSU-DLCL2 и имплантации опухоли

[00329] Клеточная линия WSU-DLCL2 была получена из Института Лейбница-DSMZ и содержалась в среде RPMI-1640 с 10% FBS с добавлением пенициллина, стрептомицина, глутамина и 1 мМ HEPES.

[00330] Клетки WSU-DLCL2 (3×10^6 клеток) собирали и смешивали с 5×10^5 МКПК и ресуспендировали в смеси 1 : 1 PBS и GFR Matrigel. Самкам мышей NSG подкожно инъецировали 100 мкл клеточной смеси в правый бок.

Дозирование антител для измерения опухоли

[00331] Перед дозированием тестируемых препаратов или контролей мышей распределяли по группам, стратифицированным в соответствии с опухолевой нагрузкой.

[00332] Антитела (REGN5837, REGN1979, REGN5671 [не-ТAAxCD28 неперекрывающий контроль бсАт] или H4sH17664D [He-ТAAxCD3 неперекрывающий контроль бсАт]) вводили в виде монотерапии или в комбинации путем внутривенной инъекции в дни 1, 8, и 15 после имплантации в дозах, указанных в Таблице 31.

Таблица 31: Дизайн эксперимента для оценки опухолевого роста и выживаемости

Группы	N на группу	Доза REGN5837 или не-ТAAxCD28	Доза REGN1979 или не-ТAAxCD3	Схема дозирования бсАт (ВБ инъекция)	Дни измерения объемов опухоли
REGN5837 + REGN1979	7	1 мг/кг	0,4 мг/кг	Дни 1, 8 и 15 после имплантации клеток WSU-DLCL2	Дни 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57 и 63 после имплантации
REGN5837 + REGN1979	7		4 мг/кг		
REGN5837 + He-ТAAxCD3	7		4 мг/кг		
He-ТAAxCD28+REGN1979	6		0,4 мг/кг		
He-ТAAxCD28+REGN1979	6 ^a		4 мг/кг		
He-ТAAxCD28+He-ТAAxCD3	7		4 мг/кг		

^a Одна мышь пала во время эксперимента и была исключена.

Измерение опухоли и назначенная конечная точка

[00333] Рост опухоли отслеживали во времени, используя штангенциркуль для измерения диаметра опухоли по X и Y (перпендикулярные измерения длины и ширины). Был рассчитан объем опухоли ($X \cdot Y \cdot [X/2]$, где X - меньший диаметр). Мышей умерщвляли, когда опухоль достигала обозначенной конечной точки опухоли (диаметр опухоли > 20 мм или изъязвление опухоли). Эта конечная точка соответствовала стандартам IACUC.

Статистический анализ опухолевого роста и выживаемости

[00334] Результаты измерения объема опухоли во времени анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки для множественных сравнений. Результаты выживаемости с

течением времени были проанализированы с использованием теста Мантела-Кокса для всех групп, а для индивидуальных групповых сравнений были выполнены дополнительные тесты Мантела-Кокса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние REGN5837 на способность REGN1979 опосредовать цитотоксичность Т-клеток в отношении клеток-мишеней WSU-DLCL2 и высвобождение цитокинов из МКПК человека

[00335] REGN5837 и REGN1979 были протестированы в комбинации в диапазоне концентраций, чтобы оценить влияние REGN5837 на опосредованную REGN1979 цитотоксичность против клеток WSU-DLCL2, активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток и высвобождение цитокинов Т-клетками человека из МКПК, как описано ранее. В таблице 30 показано влияние REGN5837 на опосредованную REGN1979 цитотоксичность в отношении клеток WSU-DLCL2, активацию Т-клеток и пролиферацию Т-клеток. Численные результаты от двух доноров-людей, демонстрирующие влияние REGN5837 на высвобождение цитокинов, суммированы в таблице 32.

Влияние REGN5837 на цитотоксичность, опосредованную REGN1979, и пролиферацию Т-клеток человека

[00336] Влияние увеличения концентраций REGN5837 на активность (EC_{50}) и эффективность (максимальный ответ) REGN1979 оценивали путем оценки опосредованной REGN1979 цитотоксичности против клеток-мишеней WSU-DLCL2, опосредованной REGN1979 активации Т-клеток и опосредованной REGN1979 пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток человека из МКПК человека. REGN5837 увеличивал эффективность REGN1979 для опосредования цитотоксичности в отношении клеток WSU-DLCL2, активации Т-клеток (измеряемой как экспрессия CD25 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺) и пролиферации Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в зависимости от концентрации. В диапазоне концентраций от 77,2 пМ до 100 нМ REGN5837 увеличивал эффективность опосредованной REGN1979 цитотоксичности Т-клеток в отношении клеток-мишеней; в диапазоне концентраций от 77,2 пМ до 2,78 нМ REGN5837 увеличивал эффективность активации и пролиферации Т-клеток, опосредованных REGN1979, но более высокие концентрации REGN5837 не увеличивали дополнительно эффективность REGN1979. Эти данные представлены графически на Фигуре 11 и в таблице 30.

Опосредованное REGN1979 высвобождение цитокинов из МКПК человека в присутствии REGN5837

[00337] Оценивали влияние возрастающих концентраций REGN5837 на эффективность и максимальный ответ опосредованного REGN1979 высвобождения цитокинов из человеческих МКПК. В присутствии человеческих МКПК и клеток WSU-DLCL2 возрастающие концентрации REGN5837 увеличивали максимальные уровни опосредованного REGN1979 высвобождения IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ и IL-17A

в зависимости от концентрации (Фигура 12). Кроме того, возрастающие концентрации REGN5837 показали тенденцию к усилению активности REGN1979 в опосредовании высвобождения цитокинов. Значения EC_{50} , максимальные уровни цитокинов и относительное увеличение выше фоновых уровней цитокинов (без REGN5837), опосредованное REGN1979, суммированы на Фигуре 12 и в таблице 32.

Таблица 32

		Фиксированная концентрация REGN5387					
		1,0 X10 ⁻⁷	1,67 X 10 ⁻⁸	2,78 X 10 ⁻⁹	4,63 X 10 ⁻¹⁰	7,72 X 10 ⁻¹¹	0
IL-4	REGN1979 EC_{50} (M) ^a	1,66 X 10 ⁻¹¹	1,53 X 10 ⁻¹¹	1,28 X 10 ⁻¹¹	1,89 X 10 ⁻¹¹	3,77 X 10 ⁻¹⁰	9,99 X 10 ⁻¹⁰
	Макс. ВЦК (пг/мл) ^b	2,637	2,793	2,705	1,560	935	775
	Кратность изменения (ВЦК) ^c	3,4	3,6	3,5	2,0	1,2	1,0
IL-2	REGN1979 EC_{50} (M)	2,81 X 10 ⁻¹¹	1,96 X 10 ⁻¹¹	5,18 X 10 ⁻¹²	5,36 X 10 ⁻¹¹	3,89 X 10 ⁻⁸	1,25 X 10 ⁻¹⁰
	Макс. ВЦК (пг/мл)	79,3	75,4	63,2	70,3	116	36,2
	Кратность изменения (ВЦК)	2,2	2,1	1,7	1,9	3,2	1,0
IL-6	REGN1979 EC_{50} (M)	5,13 X 10 ⁻¹¹	7,89 X 10 ⁻¹²	2,68 X 10 ⁻¹¹	1,45 X 10 ⁻¹²	1,61 X 10 ⁻¹⁰	7,42 X 10 ⁻¹¹
	Макс. ВЦК (пг/мл)	366	304	367	246	210	190
	Кратность изменения (ВЦК)	1,9	1,6	1,9	1,3	1,1	1,0
IL-10	REGN1979 EC_{50} (M)	3,54 X 10 ⁻¹¹	1,04 X 10 ⁻¹⁰	2,43 X 10 ⁻¹⁰	5,29 X 10 ⁻¹¹	3,34 X 10 ⁻¹¹	9,95 X 10 ⁻¹¹
	Макс. ВЦК (пг/мл)	528	683	835	633	450	512
	Кратность	1,0	1,3	1,6	1,2	0,9	1,0

	изменения (ВЦК)								
TNF альфа	REGN1979 EC₅₀ (M)	5,03 X 10 ⁻¹²	8,69 X 10 ⁻¹³	3,45 X 10 ⁻¹²	2,08 X 10 ⁻⁰³	1,62 X 10 ⁻¹⁰	2,43 X 10 ⁻¹⁰		
	Макс. ВЦК (пг/мл)	236	129	170	НВ	35,4	29,6		
	Кратность изменения (ВЦК)	8,0	4,4	5,8	НВ	1,2	1,0		
IFN- гамма	REGN1979 EC₅₀ (M)	1,17 X 10 ⁻¹⁰	5,34 X 10 ⁻¹¹	2,00 X 10 ⁻¹⁰	6,72 X 10 ⁻¹¹	6,57 X 10 ⁻¹¹	1,82 X 10 ⁻¹⁰		
	Макс. ВЦК (пг/мл)	525	537	693	348	167	2,06		
	Кратность изменения (ВЦК)	2,6	2,6	3,4	1,7	0,8	1,0		
IL- 17A	REGN1979 EC₅₀ (M)	3,22 X 10 ⁻¹⁰	1,11 X 10 ⁻¹⁰	7,60 X 10 ⁻¹¹	4,63 X 10 ⁻¹⁰	1,86 X 10 ⁻¹⁰	2,50 X 10 ⁻¹⁰		
	Макс. ВЦК (пг/мл)	26,6	25,2	20,6	33,3	21,9	20,5		
	Кратность изменения (ВЦК)	1,3	1,2	1,0	1,6	1,1	1,0		

^a REGN1979 тестировали в диапазоне концентраций от 4.8фМ до 10нМ.

^b Максимальное ВЦК описывали как максимальное плато, определяемое аппроксимацией кривой PRISM.

^c Кратность изменений в максимальном уровне цитокинов в сыворотке рассчитывали как Макс. ВЦК([M] REGN5837)/Макс.ВЦК(без REGN5837)

Сокращения: ВЦК, высвобождение цитокина; НВ, Не вычисляли. так как уровни высвобождения цитокина не достигали насыщения в диапазоне протестированных концентраций REGN1979 или когда кривая доза-эффект не могла быть построена.

Противоопухолевая эффективность введения REGN5837 в присутствии и в отсутствие субэффективных доз REGN1979

[00338] Иммунодефицитным мышам NSG с опухолями WSU-DLCL2, вводили внутрибрюшинные инъекции антител или неперекрывающиеся контроли, как описано ранее

в настоящем документе.

[00339] У мышей с опухолями обработка 1 мг/кг REGN5837 в присутствии либо 0,4, либо 4 мг/кг REGN1979 приводила к статистически значимому подавлению роста опухоли по сравнению с контрольными неперекрывающимися бсАт (бсАт не-ТААхCD28 и не-ТААхCD3) на 28-й день (через 6 дней после последней дозы антител (Фигуры 13А и 13В). Комбинация 1 мг/кг REGN5837 и 0,4 мг/кг REGN1979 на 46-й день привела к значительному уменьшению объема опухоли по сравнению с монотерапией REGN1979.

[00340] Монотерапия при помощи REGN1979 как в дозе 0,4, так и в дозе 4 мг/кг к 28 дню приводила к умеренному подавлению опухоли по сравнению с неперекрывающимся контролем, тогда как монотерапия REGN5837 не имела эффекта. Быстрый рост опухоли наблюдался при дозировании контрольных неперекрывающихся бсАт в течение всего периода дозирования, и все мыши были умерщвлены на 125 день.

[00341] Тест Мантела-Кокса выявил статистически значимые различия в выживаемости во всех группах ($p=0,0001$), и для сравнений между группами были выполнены дополнительные тесты Мантела-Кокса. Значительное увеличение выживаемости наблюдалось у мышей, получавших дозу 1 мг/кг REGN5837 в комбинации с 0,4 или 4 мг/кг REGN1979 (соответственно, выживаемость 85% и 70%) по сравнению с мышами, получавшими дозу неперекрывающихся контрольных антител (отсутствие выживания) (Фигура 14).

[00342] Кроме того, значительное увеличение выживаемости наблюдалось у мышей, получавших дозу 1 мг/кг REGN5837 в комбинации с 0,4 или 4 мг/кг REGN1979, по сравнению с мышами, получавшими дозу монотерапии REGN5837 или REGN1979.

[00343] Настоящее изобретение не должно ограничиваться в объеме конкретными вариантами воплощения, 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 и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:
 - а) первый антигенсвязывающий домен (D1), который связывает человеческий CD28;и
 - б) второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфично связывает человеческий CD22 с опухолевой клеткой-мишенью.
2. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен (D2) связывает эпитоп на человеческом CD22, содержащий одну или более аминокислот из SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 и/или SEQ ID NO:59.
3. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает человеческий CD22 с K_D менее чем приблизительно 15 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.
4. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-3, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает CD22 *Macaca fascicularis* с K_D менее чем приблизительно 60 мкМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.
5. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-4, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает человеческий CD28 с K_D менее чем приблизительно 45 мкМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.
6. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-5, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью клеток, экспрессирующих человеческий CD28, с EC_{50} менее чем приблизительно 1×10^{-8} М, как измерено с помощью анализа связывания *in vitro* FACS.
7. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-6, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью клеток, экспрессирующих человеческий CD22, с EC_{50} менее чем приблизительно 1×10^{-8} М, как измерено при анализе связывания *in vitro* с помощью FACS.
8. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-7, отличающаяся тем, что указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула демонстрирует костимулирующий эффект при использовании в сочетании с биспецифичным антителом против CD20xCD3.
9. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 8, отличающаяся тем, что костимулирующий эффект представляет собой одно или более из следующего: активация Т-клеток, индуцирование высвобождения IL-2, индуцирование повышающей регуляции CD25+ в человеческих МКПК; и увеличение опосредованной Т-клетками человека цитотоксичности в отношении линий клеток, экспрессирующих CD22.

10. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-9, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен (D1) содержит:

а) три участка, определяющие комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислоту SEQ ID NO:26; и

б) три участка, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

11. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 10, отличающаяся тем, что содержит:

а) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

12. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 10, отличающаяся тем, что содержит:

а) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

13. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 10, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28, 30 и 32, и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14 и 16.

14. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 10, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:26/10.

15. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-14, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) три HCDR, содержащиеся в HCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2 и 18; и

б) три LCDR, содержащиеся в LCVR, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

16. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 15, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 20;

б) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6 и 22, и

в) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8 и 24.

17. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 16, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

18. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 17, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 6, 8; и 20, 22, 24; и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14, 16.

19. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-18, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит участки CDR HCVR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:28, 30, 32, и участки CDR LCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14, 16; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит участки CDR HCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, и участки CDR LCVR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14, 16.

20. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-18, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит участки HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28, 30, 32, и участки LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14, 16; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит участки HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:20, 22, 24, и участки LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 14, 16.

21. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-18, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:26/10; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2/10.

22. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. 1-18, отличающаяся тем, что

а) первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:26/10; и

б) второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:18/10.

23. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая

конкурирует за связывание с CD22 или связывается с тем же эпитопом на CD22, что и референсное антитело, при этом референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:26/10 и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2/10 или 18/10.

24. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с человеческим CD28 или связывается с тем же эпитопом на человеческом CD28, что и референсное антитело, при этом референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:26/10 и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2/10 или 18/10.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из п.п. 1-24 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

26. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифичное антитело по любому из п.п. 1-24.

27. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 26.

28. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п. 27.

29. Способ ингибирования нарушения пролиферации В-клеток у индивида, включающий введение выделенного биспецифичного антитела по любому из п.п. 1-24 или фармацевтической композиции по п. 25 индивиду, тем самым подавляя рост В-клеточной лимфомы у индивида.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий введение индивиду второго терапевтического агента.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает: противоопухолевый агент, лучевую терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

32. Способ лечения пациента, страдающего нарушением пролиферации В-клеток или другим злокачественным новообразованием клеток, экспрессирующих CD22, включающий введение выделенного биспецифичного антитела по любому из п.п. 1-24 или фармацевтической композиции по п. 25 индивиду, таким образом обеспечивая лечение пациента, страдающего В-клеточной лимфомой или другим злокачественным новообразованием клеток, экспрессирующих CD-22.

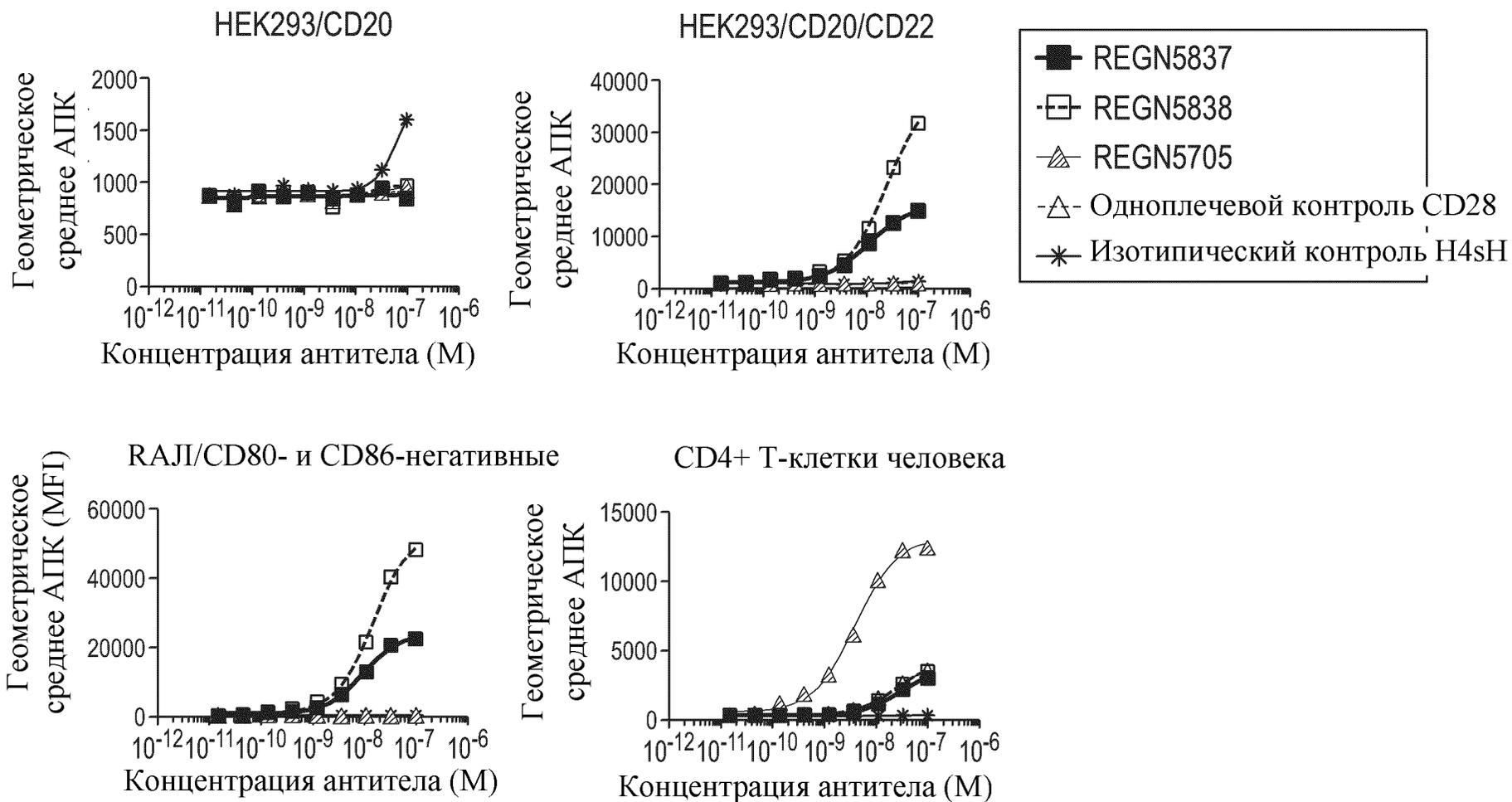
33. Способ по п. 32, дополнительно включающий введение индивиду второго терапевтического агента.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает: противоопухолевый агент, лучевую терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство,

биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

35. Способ по любому из п.п. 31 или 34, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой другое биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывается с тем же целевым антигеном опухоли, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 на Т-клетках.

По доверенности

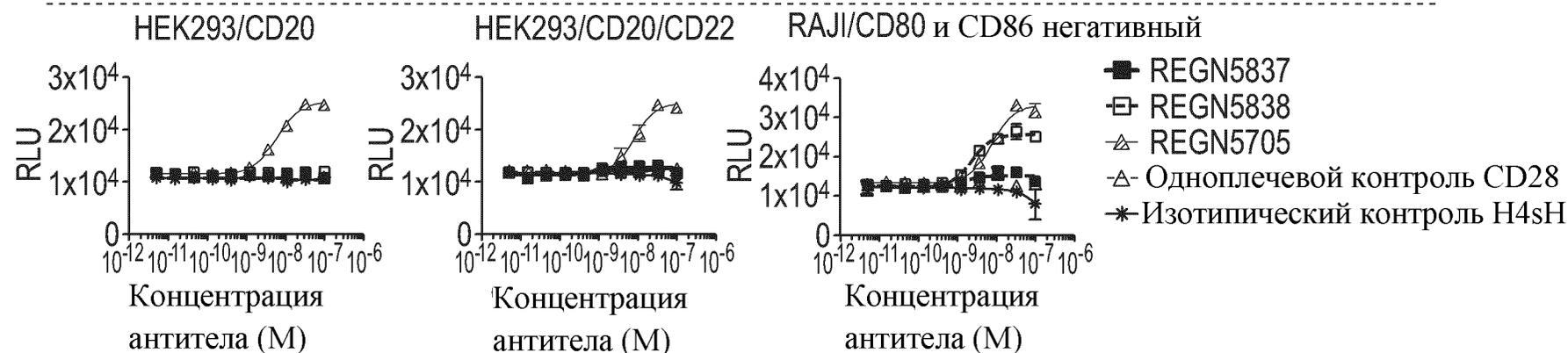


ФИГ. 1

Биспецифические антитела к CD28 увеличивают продукцию люциферазы в присутствии стимуляции первичных Т-клеток и экспрессии CD22 на мишени

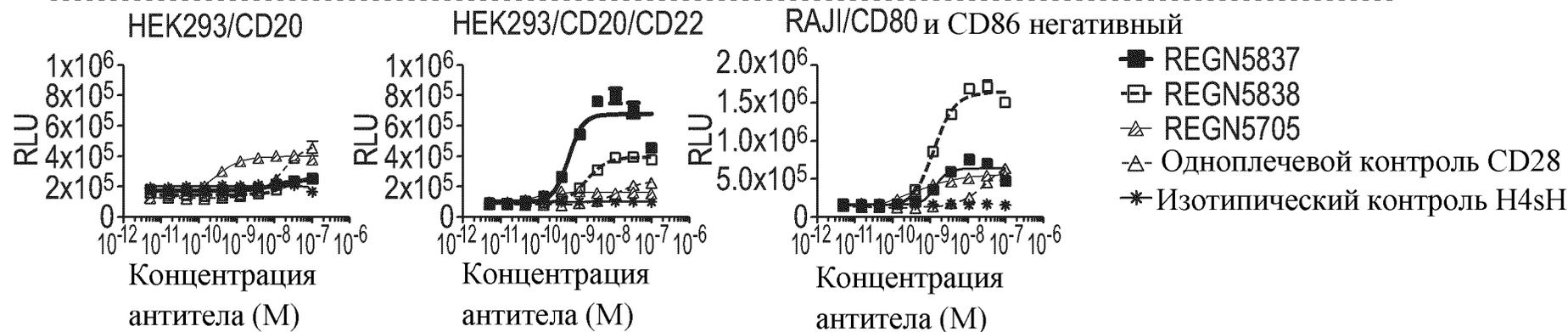
ФИГ. 2А

Изотипический контроль + hlgG4



ФИГ. 2В

+ REGN2281

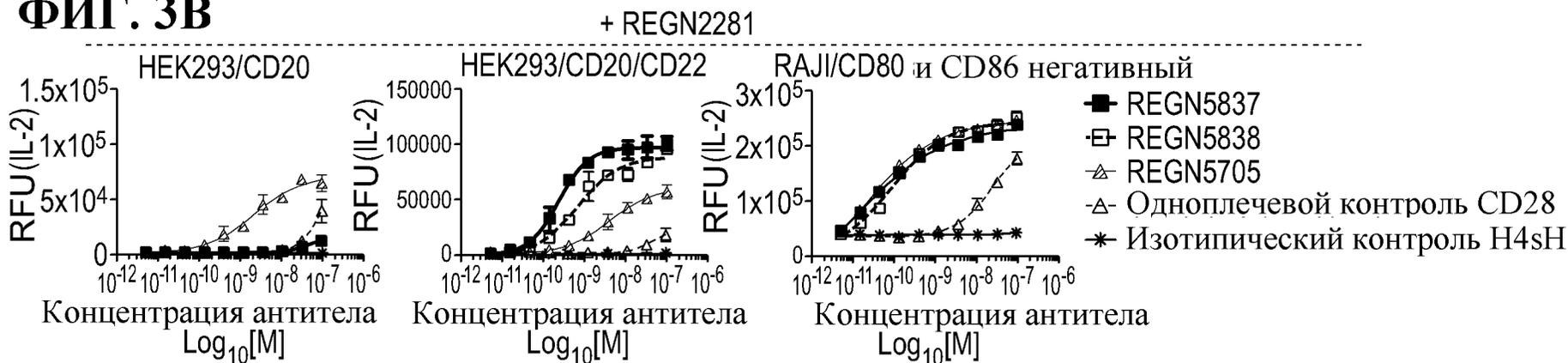


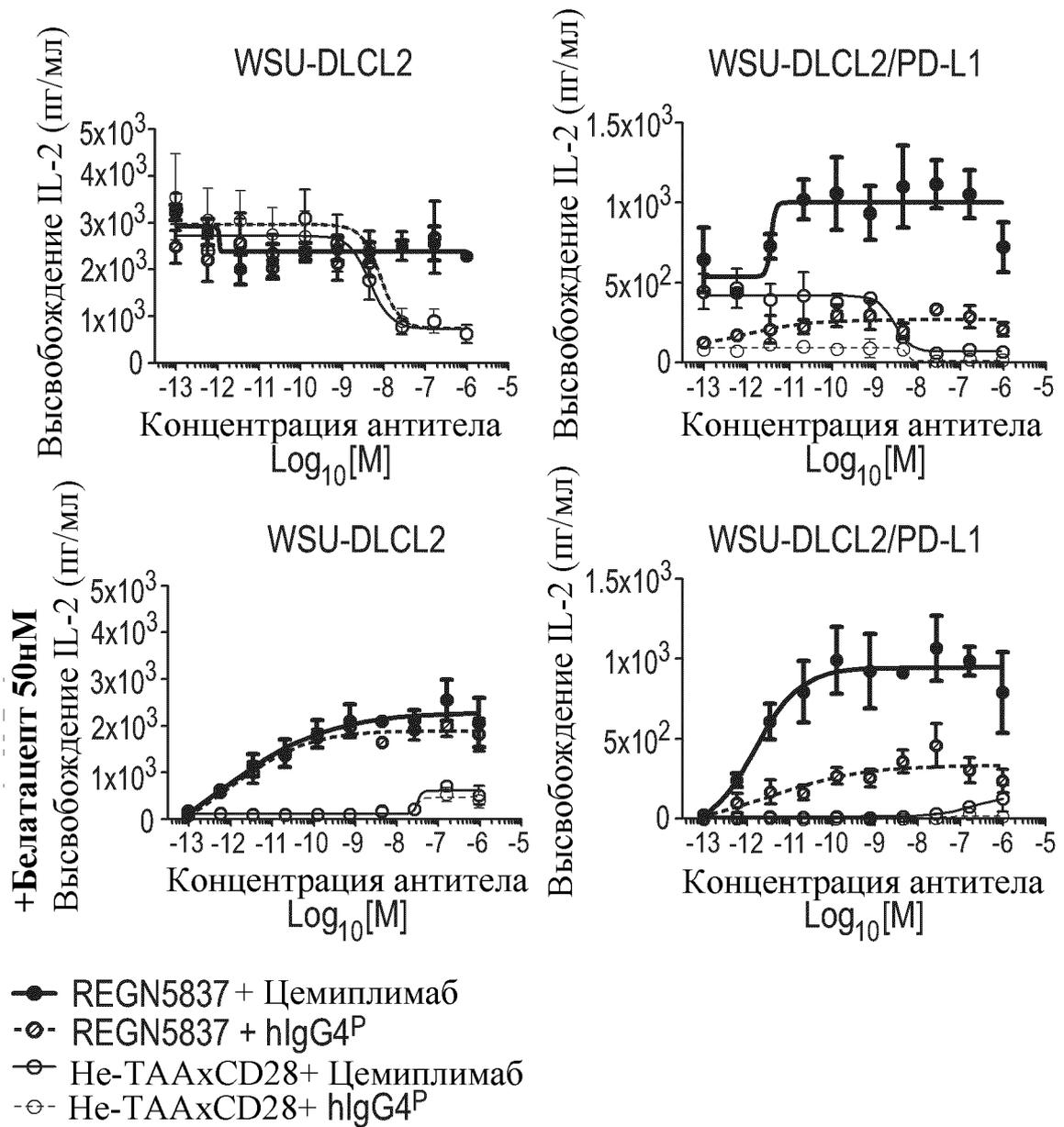
Биспецифические антитела к CD28 увеличивают продукцию IL-2 в присутствии стимуляции первичных Т-клеток и экспрессии CD22 на мишени

ФИГ. 3А



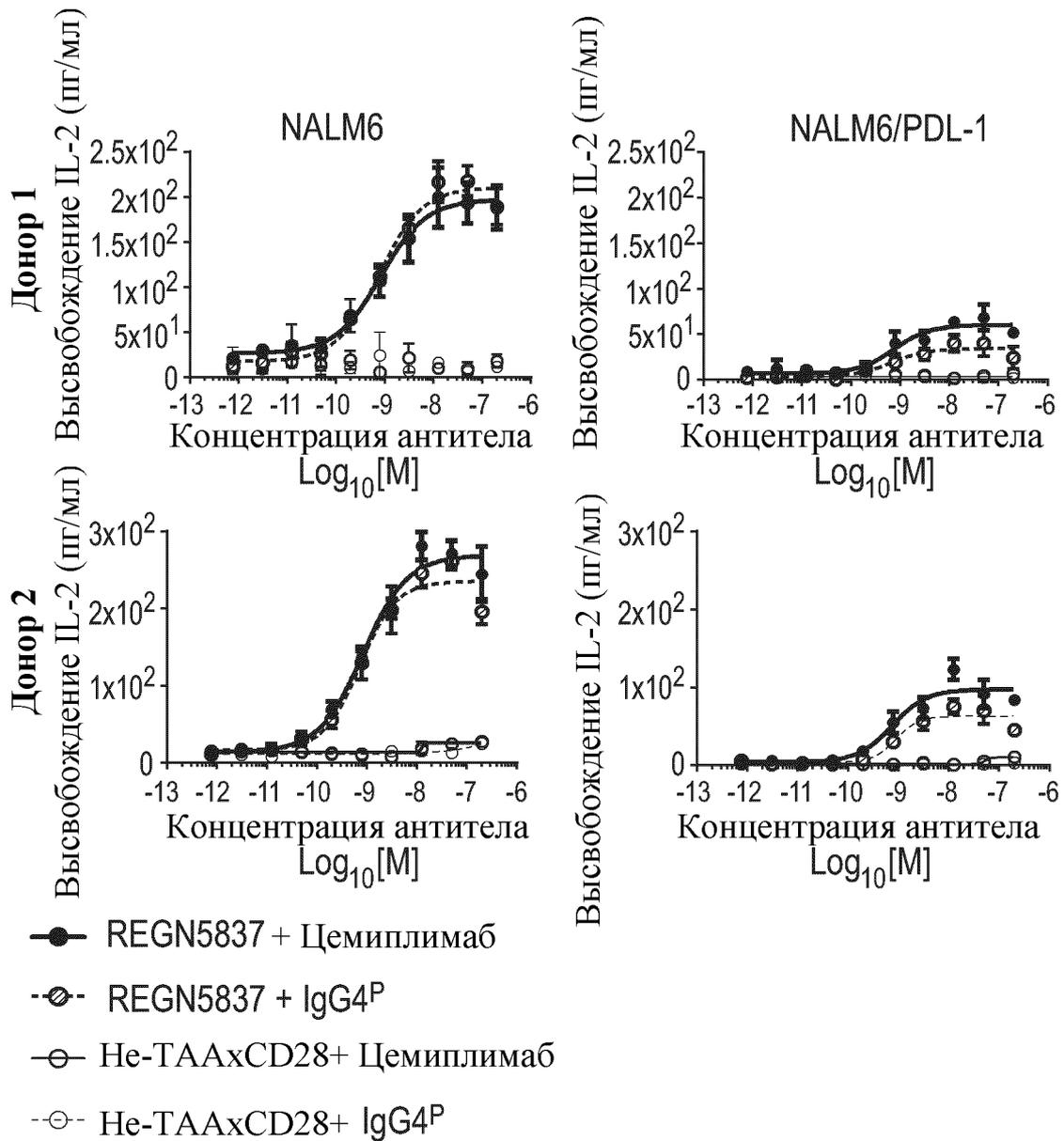
ФИГ. 3В





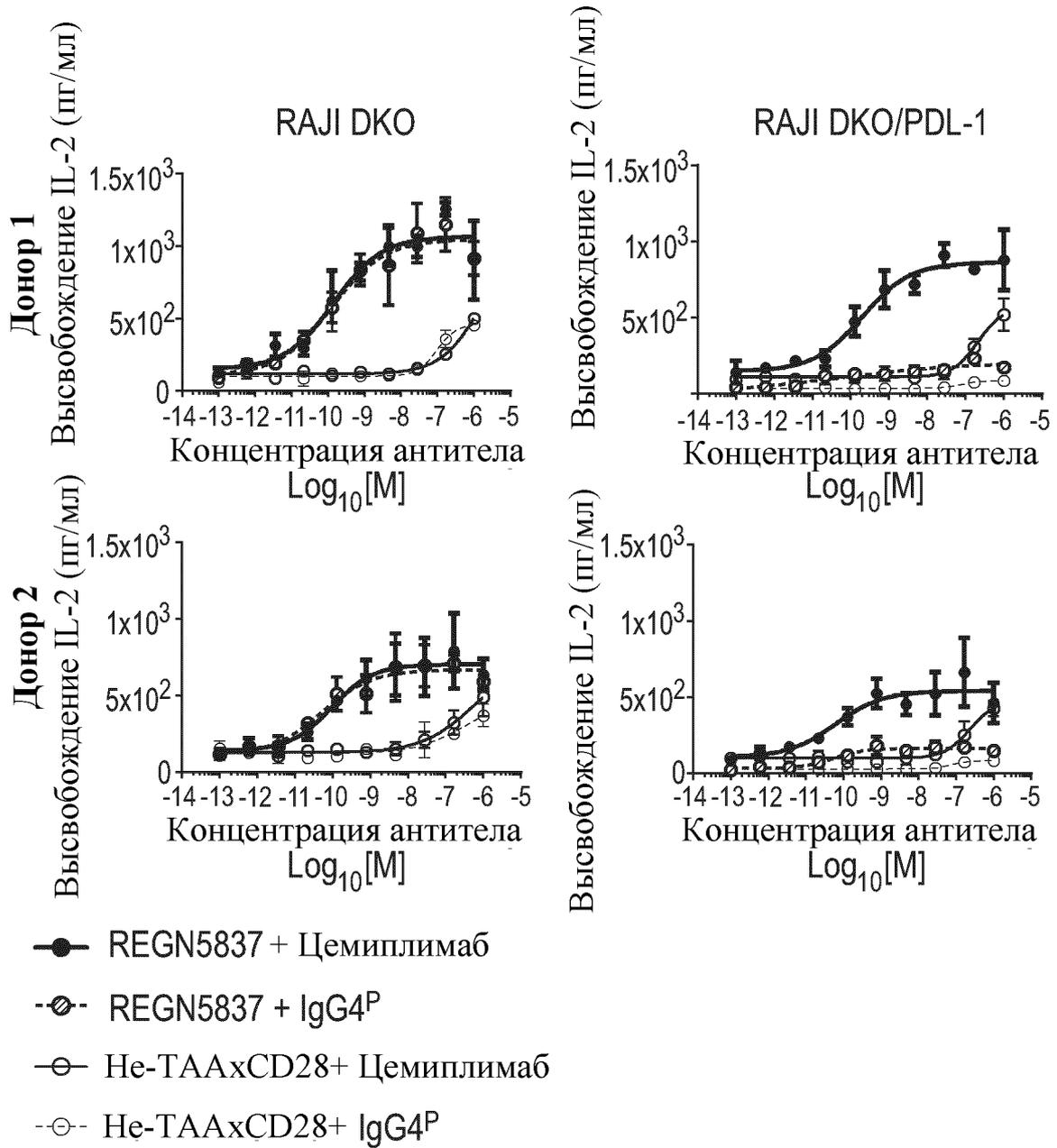
Комбинация REGN5837 + цемиплимаб увеличивает максимальное высвобождение IL-2 в присутствии клеток WSU-DLCL2, экспрессирующих PD-L1, особенно в присутствии белатацепта.

ФИГ. 4



Комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках NALM6, сконструированных для экспрессии PD-L1

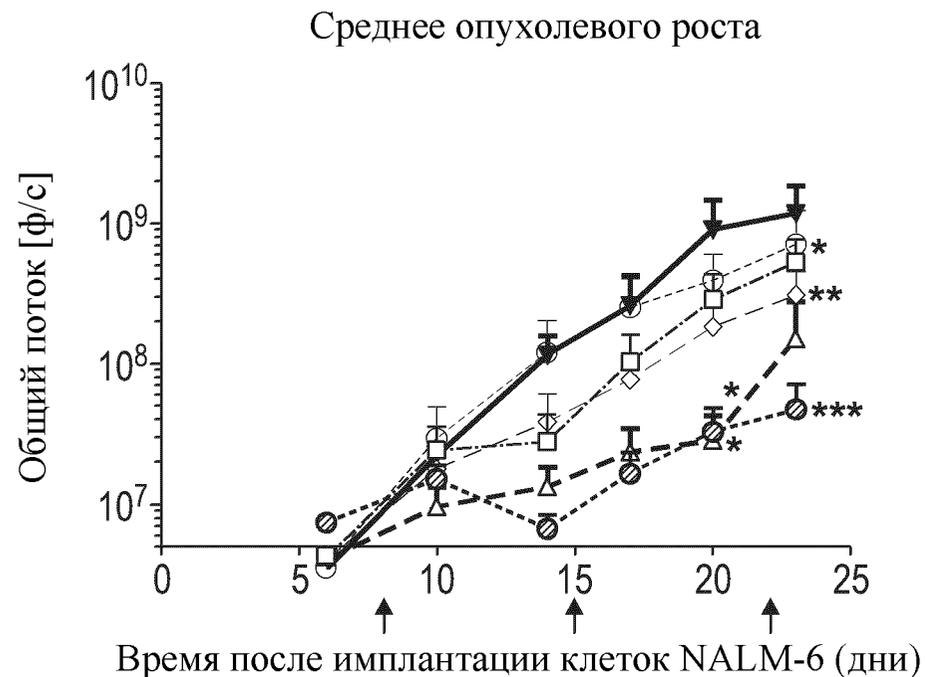
ФИГ. 5А



Комбинация REGN5837 с цемиплимабом усиливает высвобождение IL-2 по сравнению с обработкой одним только REGN5837 в клетках RAJI, сконструированных для экспрессии PD-L1

ФИГ. 5В

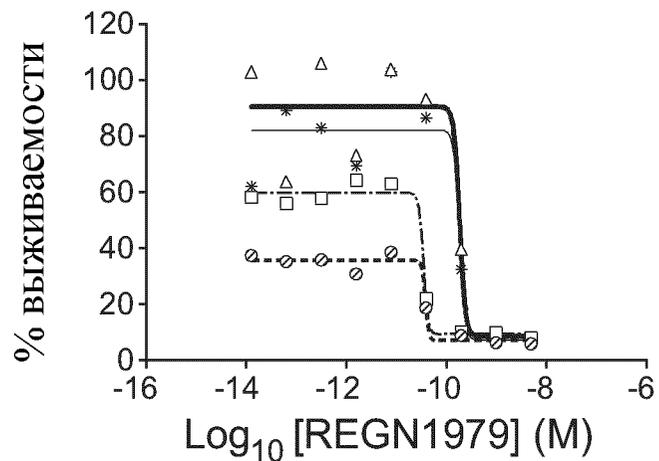
Лечение мышей NSG, несущих опухоли NALM-6-Luc, с помощью REGN5837 в присутствии REGN1979 связано со значительным подавлением опухоли



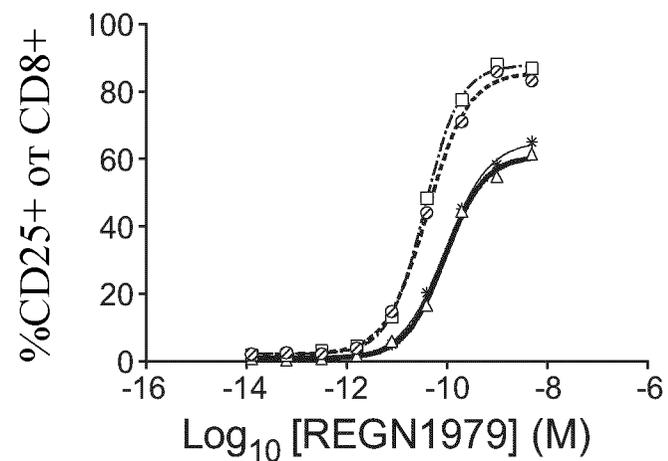
—▲— 4 мг/кг He-TAAxCD28 + 0,04 мг/кг He-TAAxCD3 -●- 4 мг/кг REGN5837 + 0,04 мг/кг REGN1979
 -□- 4 мг/кг He-TAAxCD28 + 0,04 мг/кг REGN1979 -△- 0,4 мг/кг REGN5837 + 0,04 мг/кг REGN1979
 -○- 4 мг/кг REGN5837 + 0,04 мг/кг He-TAAxCD3 -◇- 0,4 мг/кг REGN5837 + 0,04 мг/кг He-TAAxCD3

ФИГ. 6

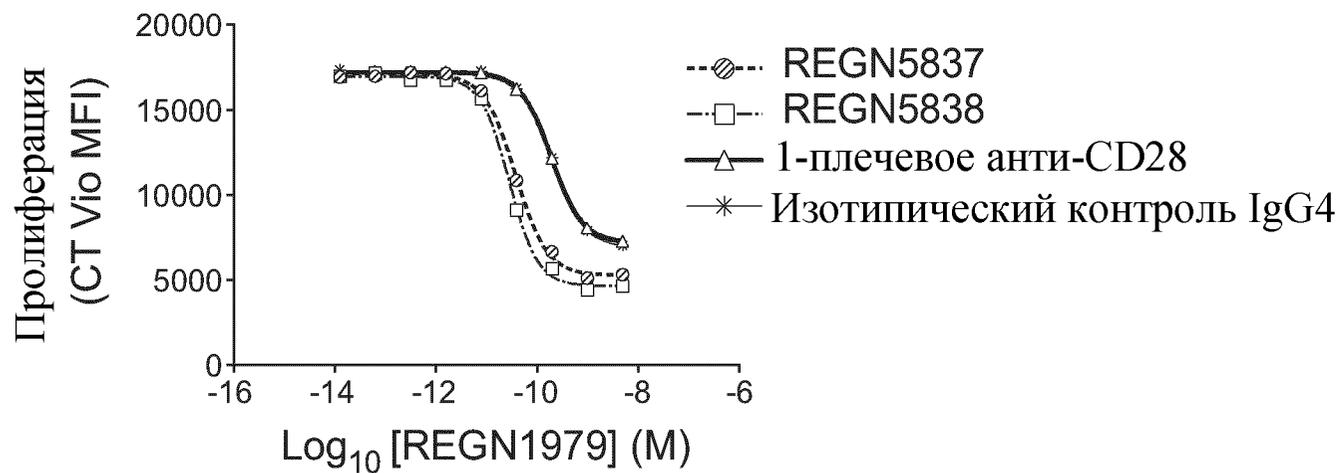
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

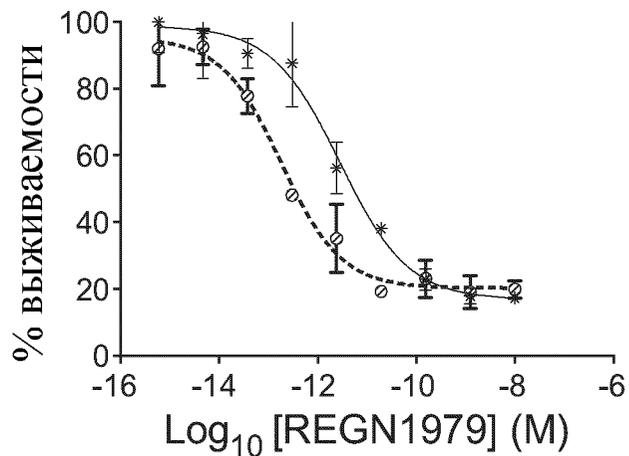


ФИГ. 7С

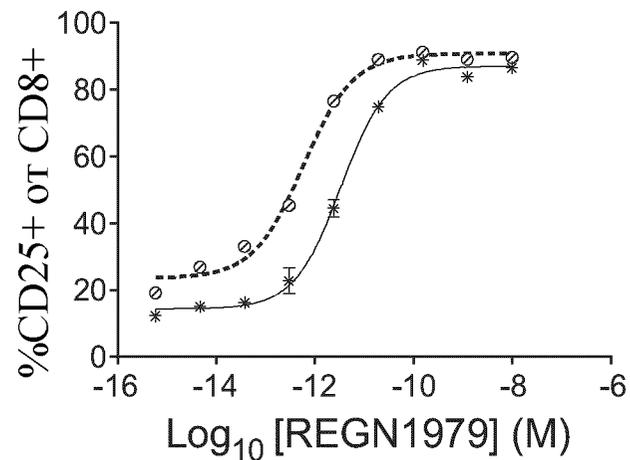


Цитотоксичность и активация Т-клеток - клетки-мишени Nalm6

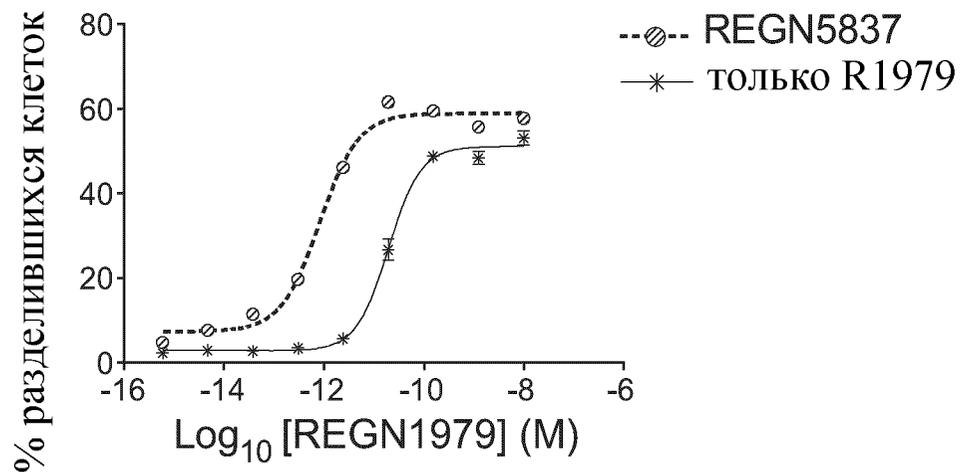
ФИГ. 8А



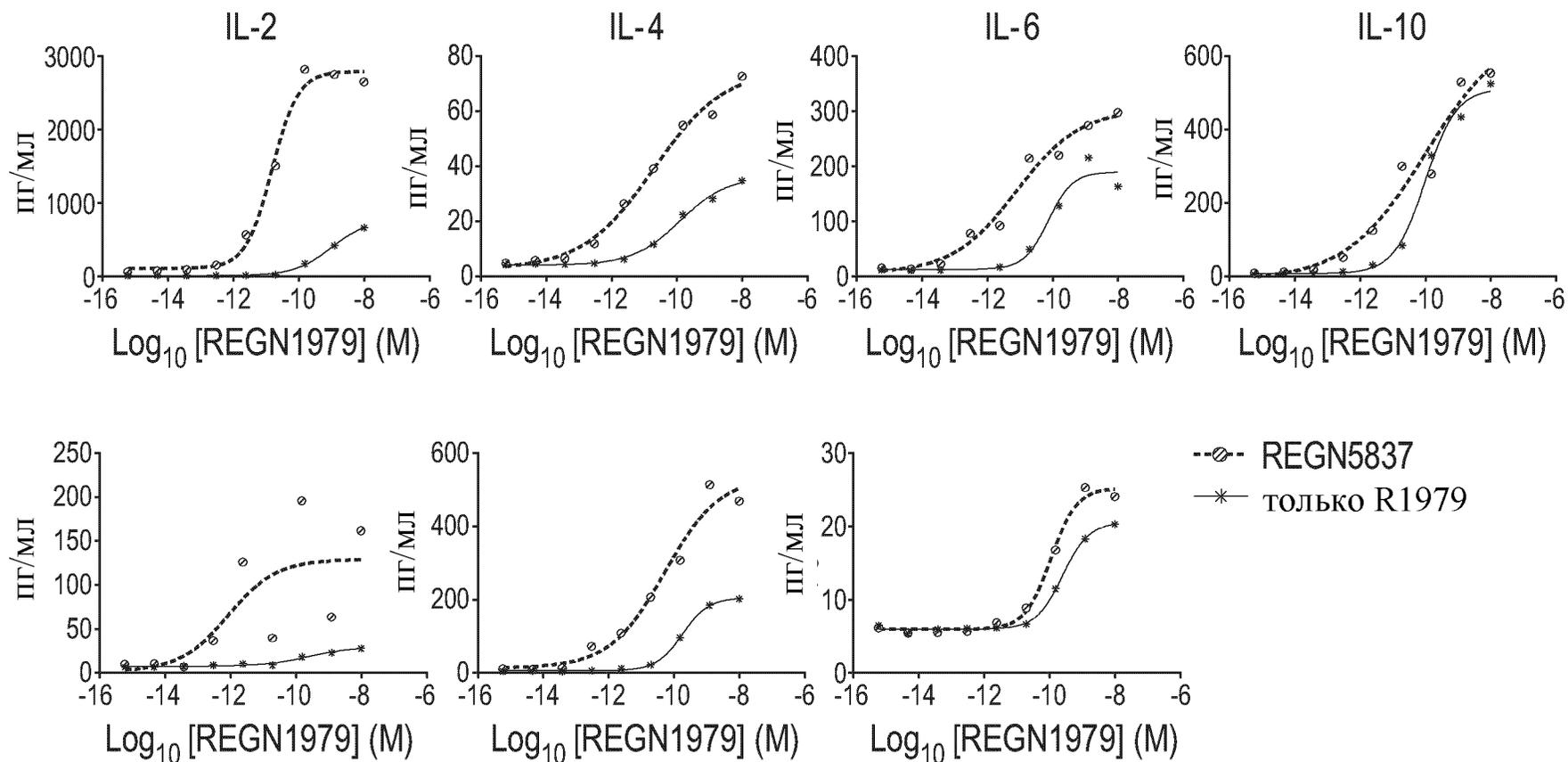
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С



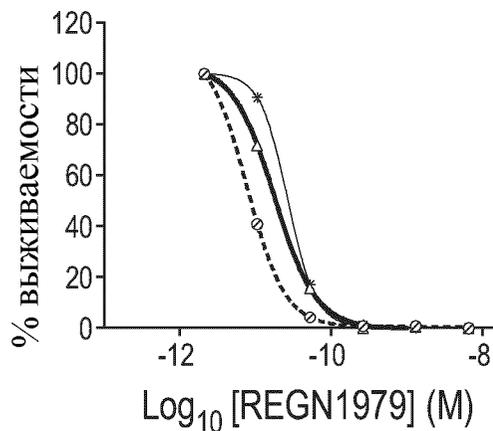
Цитотоксичность и активация Т-клеток - клетки-мишени WSU-DLCL2 (результаты 2 экспериментов)



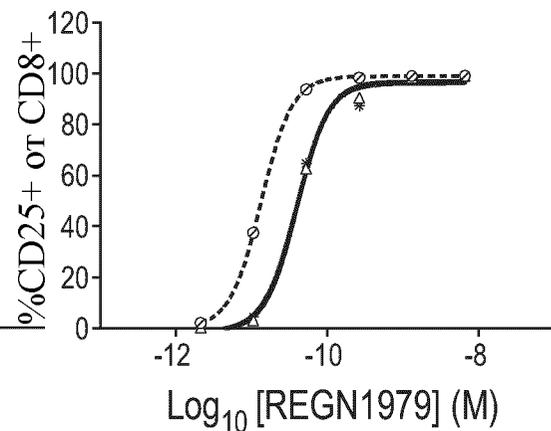
Высвобождение цитокинов по данным анализа цитотоксичности с WSU-DLCL2 (результаты 2 экспериментов)

ФИГ. 9

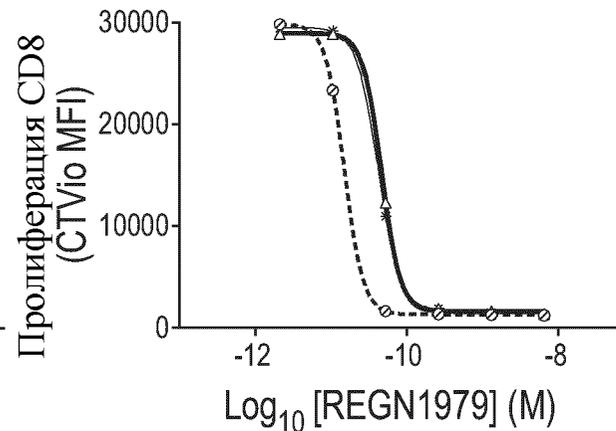
ФИГ. 10А



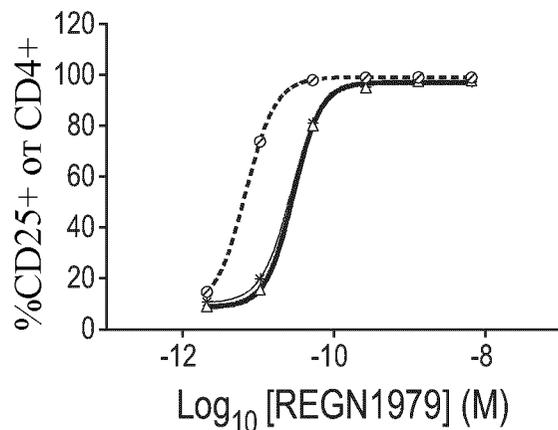
ФИГ. 10В



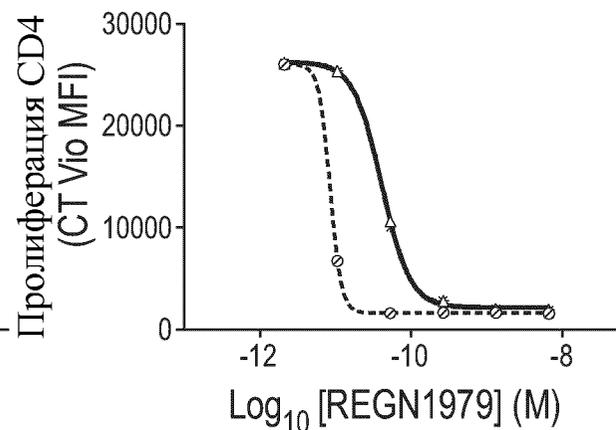
ФИГ. 10С



ФИГ. 10D



ФИГ. 10Е

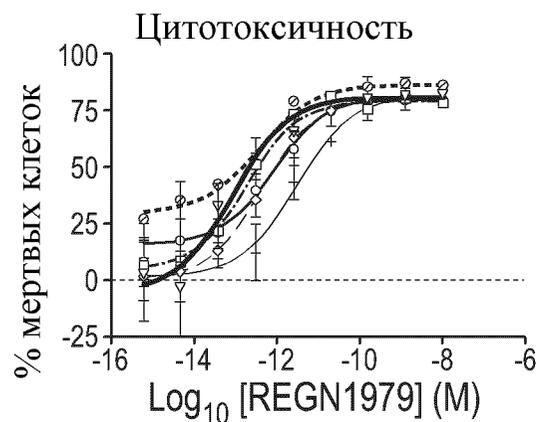


- R5837
- △— 1-плечевое анти-CD28
- *— только R1979

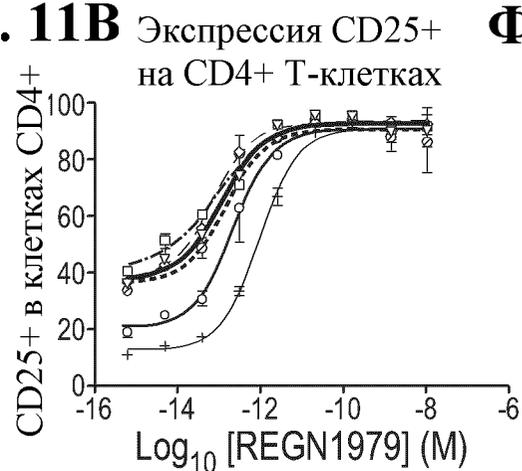
Цитотоксичность, активация и пролиферация Т-клеток

REGN5837 увеличивает эффективность опосредованной REGN1979 цитотоксичности, экспрессию CD25 на клеточной поверхности и пролиферацию Т-клеток зависимым от концентрации образом

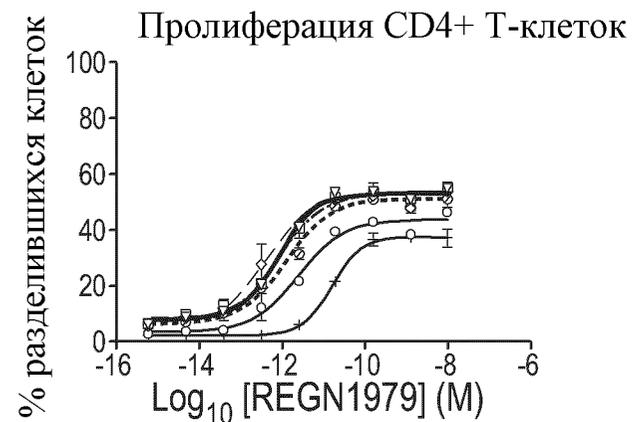
ФИГ. 11А



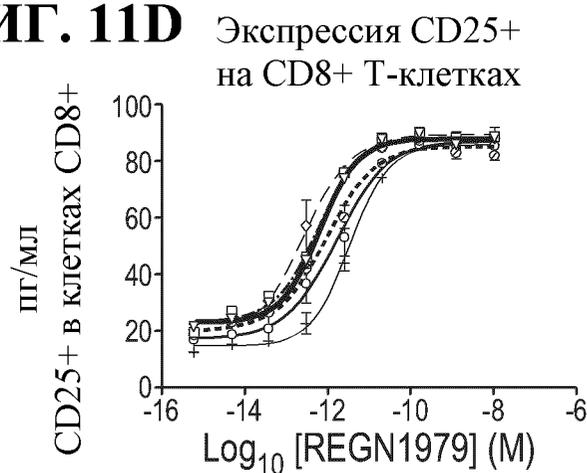
ФИГ. 11В



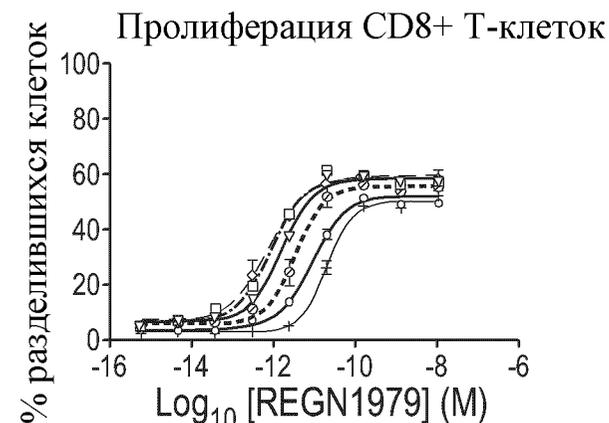
ФИГ. 11С



ФИГ. 11D



ФИГ. 11Е

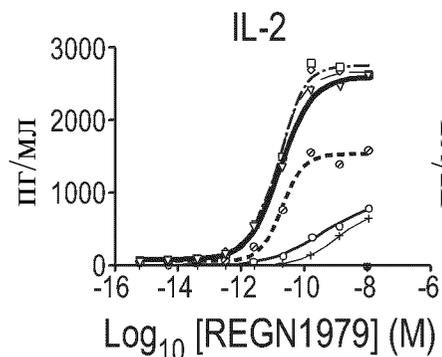


Фиксированная концентрация REGN5837 (M)

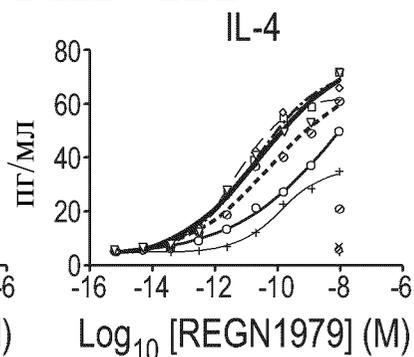
- ▽— 1.00x10⁻⁷
- 1.67x10⁻⁸
- ◇- 2.78x10⁻⁹
- 4.63x10⁻¹⁰
- 7.72x10⁻¹¹
- + 0

REGN5837 увеличивает эффективность и максимальные уровни опосредованного REGN1979 высвобождения цитокинов из Т-клеток человека зависимым от концентрации образом в присутствии клеток В-клеточной лимфомы WSU-DLCL2

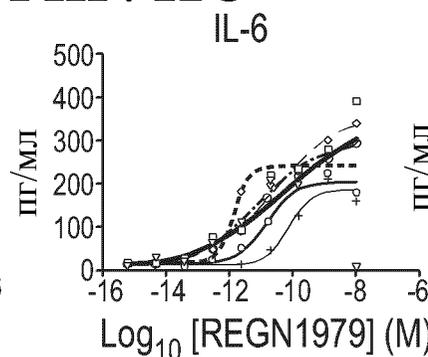
ФИГ. 12А



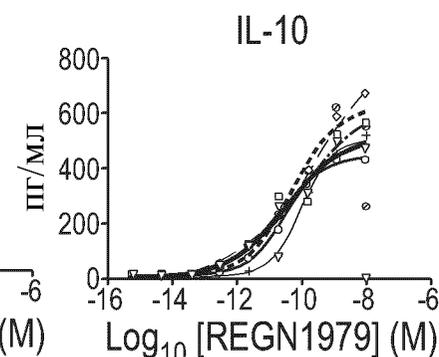
ФИГ. 12В



ФИГ. 12С



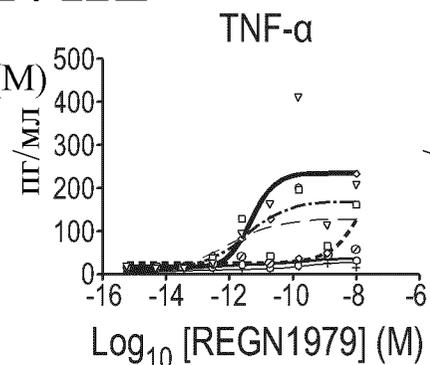
ФИГ. 12D



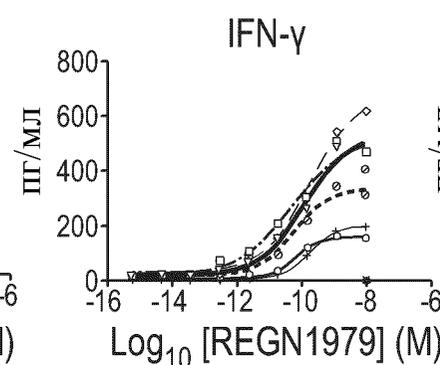
ФИГ. 12Е

Фиксированная
концентрация REGN5837 (M)

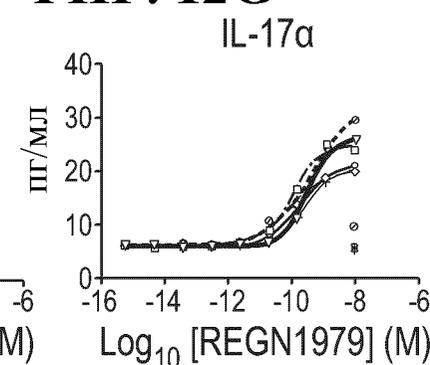
- ▽— 1.00x10⁻⁷
- 1.67x10⁻⁸
- ◇- 2.78x10⁻⁹
- 4.63x10⁻¹⁰
- 7.72x10⁻¹¹
- +— 0



ФИГ. 12F



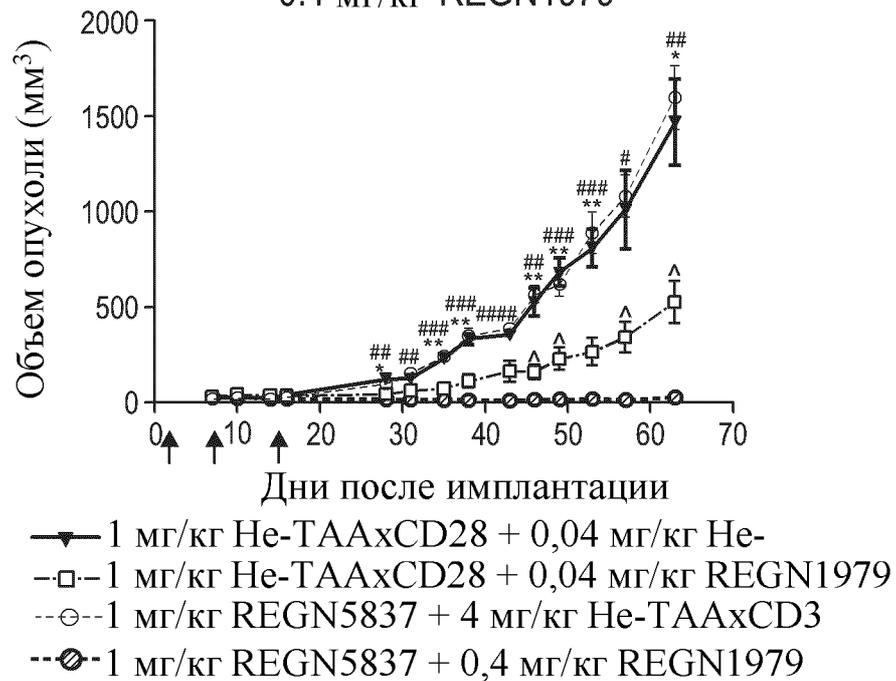
ФИГ. 12G



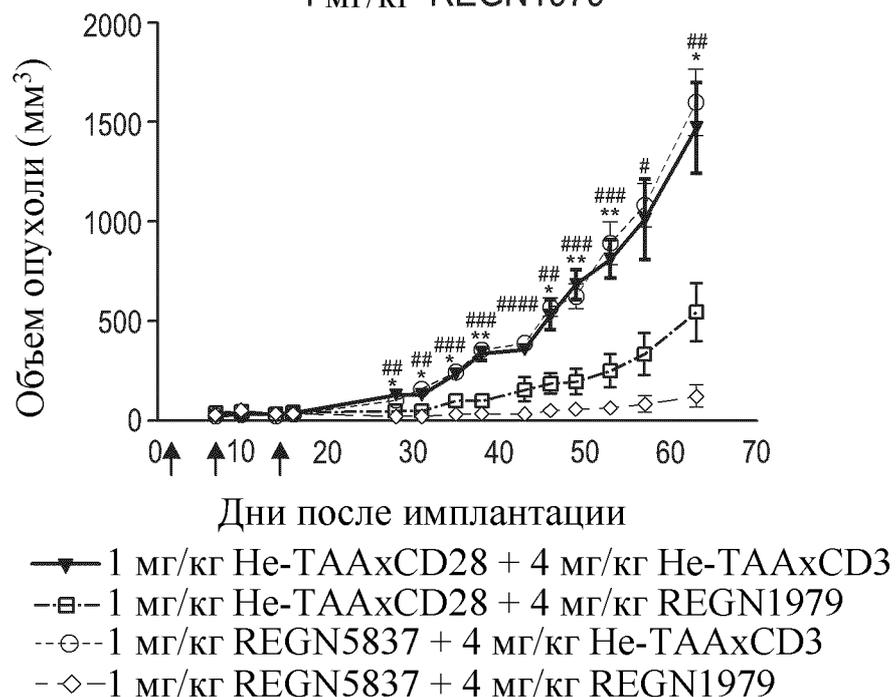
Лечение мышей NSG, несущих опухоли WSU-DLCL2, с помощью REGN5837 в присутствии субэффективных доз REGN1979 связано со значительным подавлением опухоли

ФИГ. 13А

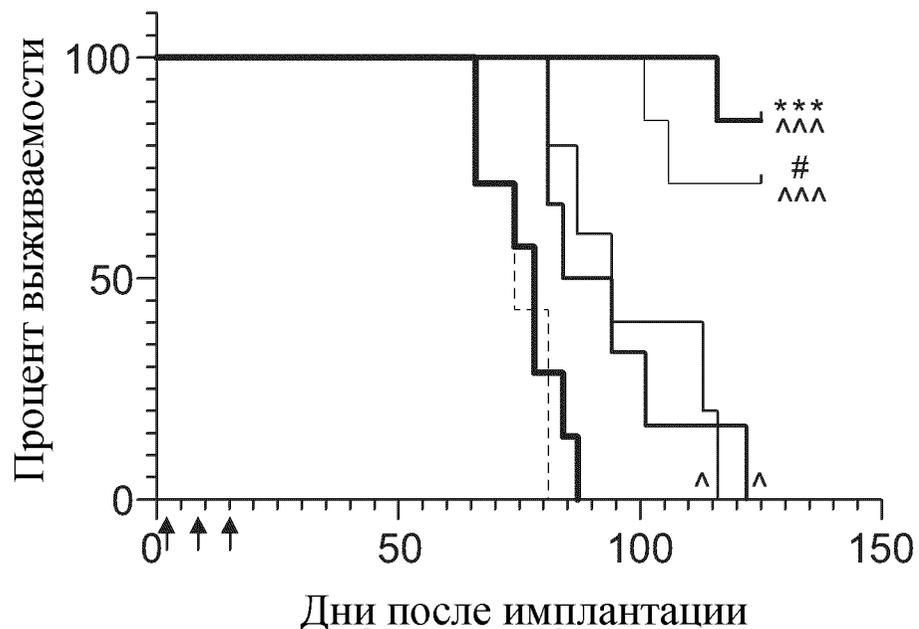
Среднее опухолевого роста
0.4 мг/кг REGN1979

**ФИГ. 13В**

Среднее опухолевого роста
4 мг/кг REGN1979



Лечение мышей NSG, несущих опухоли WSU-DLCL2, с помощью REGN5837 в присутствии субэффективных доз REGN1979 связано со значительно большей выживаемостью по сравнению с монотерапией REGN5837 или REGN1979



- 1 мг/кг REGN5837 + 0.4 мг/кг REGN1979
- 1 мг/кг REGN5837 + 4 мг/кг REGN1979
- 1 мг/кг He-TAAxCD28 + 0.4 мг/кг REGN1979
- 1 мг/кг He-TAAxCD28 + 4 мг/кг REGN1979
- - 1 мг/кг REGN5837 + 4 мг/кг He-TAAxCD3
- 1 мг/кг He-TAAxCD28 + 4 мг/кг He-TAAxCD3

ФИГ. 14