

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191677** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.03

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

(22) Дата подачи заявки
2019.12.18

(54) БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-MUC16 X АНТИ-CD28 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/782,142; 62/815,861

(32) 2018.12.19; 2019.03.08

(33) US

(86) PCT/US2019/067109

(87) WO 2020/132024 2020.06.25

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Мерфи Эндрю Дж., Скокос Димитрис,

Уэйт Джейнелл, Уллман Эрика,

Херманн Айнур, Смит Эрик, Абер

Лорик, Янкопулос Джордж Д.,

Кроуфорд Элисон (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает MUC16 человека. В определенных вариантах реализации биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих MUC16, таких как опухоли яичников. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения заболеваний и расстройств, при которых желателен и/или терапевтически эффективен повышенный или индуцированный нацеленный иммунный ответ.

A1

202191677

202191677

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569091EA/019

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА АНТИ-MUC16 X АНТИ-CD28 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка связана с предварительной заявкой США № 62/782142, поданной 19 декабря 2018 г., и предварительной заявкой США № 62/815861, поданной 8 марта 2019 г., и испрашивает приоритет на их основании. Полное содержание вышеупомянутых заявок в явном виде включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 18 декабря 2019 г., названа 10493WO01_118003_49320_SeqLst.txt и имеет размер 38372 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD28 и молекулу-мишень, такую как MUC16, а также к способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] CD28 представляет собой трансмембранный белок I типа, который имеет единственный внеклеточный Ig-подобный домен V-типа, собранный в виде гомодимера, и который экспрессируется на поверхности Т-клеток. CD28 представляет собой рецептор для белков CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) и активируется CD80 или CD86, экспрессируемыми на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Связывание CD28 с CD80 или CD86 обеспечивает костимулирующие сигналы, важные для активации и выживания Т-клеток. Стимуляция Т-клеток посредством CD28, в дополнение к Т-клеточному рецептору (TCR), обеспечивает мощный сигнал для выработки 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, высвобождение цитокинов и уничтожение клеток Т-клетками.

[0005] Антитела к CD28 были предложены для применения в терапевтических целях, включая активацию Т-клеток. Одно конкретное антитело к CD28, TGN1412 (суперагонист к CD28), применяли в клиническом исследовании в 2006 году. Шести здоровым добровольцам внутривенно вводили TGN1412 (суперагонист к CD28) в дозе 0,1 мг/кг. В течение двух часов у всех шести пациентов развились значительные воспалительные ответы (цитокиновый шторм), и в течение шестнадцати часов у всех пациентов развилась полиорганная недостаточность. Субъектов лечили кортикостероидами, и уровни цитокинов вернулись к нормальным уровням в течение 2-3 дней. Начальная доза 0,1 мг/кг в

исследовании фазы 1 была основана на 500-кратном превышении уровня, при котором не наблюдается неблагоприятного воздействия («NOAEL»), составившем 50 мг/кг у яванских макаков (Suntharalingam, *et al.*, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, NEJM 355:1018-1028 (2006)). К сожалению, цитокиновый шторм, индуцированный TGN1412, не был предсказан токсикологическими исследованиями на яванских макаках или исследованиями моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека *ex vivo*.

[0006] Муцин 16 (MUC16), также известный как раковый антиген 125, карциномный антиген 125, углеводный антиген 125 или CA-125, представляет собой высокогликозилированный интегральный мембранный гликопротеин. MUC16 содержит три основных домена: внеклеточный N-концевой домен, большой домен с тандемными повторами, перемежающийся с доменами белка спермы морского ежа, энтерокиназы, агрина (SEA), и карбоксиконцевой домен, который содержит сегмент трансмембранной области и короткий цитоплазматический хвост. Протеолитическое расщепление приводит к попаданию внеклеточной части MUC16 в кровоток. MUC16 сверхэкспрессируется при разных видах рака, включая рак яичников, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутривенечную холангиокарциному в массивной форме, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта, а также при заболеваниях и патологических состояниях, включая воспалительное заболевание кишечника, цирроз печени, сердечную недостаточность, перитонеальную инфекцию и хирургию органов брюшной полости. (Haridas, D. *et al.*, 2014, FASEB J., 28:4183-4199). Было показано, что экспрессия MUC16 на раковых клетках защищает указанные раковые клетки от иммунной системы. (Felder, M. *et al.*, 2014, Molecular Cancer, 13:129).

[0007] Были изучены способы лечения рака яичников с применением антител к MUC16. Однако моноклональные антитела, ореговомаб и абговомаб, демонстрировали ограниченную эффективность. (Felder, см. выше, Das, S. и Batra, SK 2015, Cancer Res. 75: 4660-4674). Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных антителах к MUC16 для лечения рака.

[0008] Кроме того, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как CD28, так и антиген-мишень, такой как MUC16, можно применять в терапевтических ситуациях, при которых желательным является специфичное нацеливание на опухолевые клетки и опосредуемое Т-клетками уничтожение клеток, которые экспрессируют указанный антиген-мишень.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD28 и MUC16; также упоминаемые в настоящем документе как «биспецифичные молекулы против CD28/MUC16». Анти-MUC16 часть биспецифичной молекулы против CD28/MUC16 можно применять для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют MUC16

(например, клетки опухоли яичников), а анти-CD28 часть биспецифичной молекулы можно применять для активации Т-клеток. Одновременное связывание MUC16 на опухолевой клетке и CD28 на Т-клетке способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой. Таким образом, биспецифичные молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно применять, помимо прочего, для лечения заболеваний и расстройств, связанных с MUC16-экспрессирующими опухолями (например, раком яичников) или вызванных ими.

[0010] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16. Настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы против CD28/MUC16 (например, биспецифичные антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с вариабельной областью легкой цепи (LCVR). В определенных типичных вариантах реализации настоящего изобретения каждый из антигенсвязывающего домена против CD28 и антигенсвязывающего домена против MUC16 содержит разные отдельные HCVR, спаренные с общей LCVR.

[0011] Согласно настоящему изобретению предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в **Таблице 3**. Первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, также может содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в **Таблице 3**. В соответствии с определенными вариантами реализации первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленных в **Таблице 3**. Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, причем указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, представленных в **Таблице 3**, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, представленных в **Таблице 3**.

[0012] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения предложены биспецифичные молекул против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 42, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0013] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0014] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/10 и 42/34.

[0015] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 48, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0016] В определенных вариантах реализации первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/16 и 48/40.

[0017] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам против CD28/MUC16, в которых указанный первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 44, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 46, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, или по существу схожую с ними

последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0018] Некоторые неограничивающие типичные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению включают первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20-22-24-12-14-16 и 44-46-48-36-38-40.

[0019] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 26, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0020] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0021] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 и 26/34.

[0022] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 32, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0023] В определенных вариантах реализации второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 и 32/40.

[0024] Согласно настоящему изобретению также предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 28, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 30, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, или по существу схожую с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0025] Определенные неограничивающие типичные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению включают второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 и 28-30-32-36-38-40.

[0026] В связанном варианте реализации настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, в которых указанный второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в последовательностях вариабельной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 и 26/34.

[0027] В другом аспекте настоящего изобретения предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR биспецифичных антигенсвязывающих молекул против CD28/MUC16, раскрытых в

настоящем документе, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в **Таблице 2** и/или в **Таблице 4** в настоящем документе, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более полинуклеотидных последовательностей, представленных в **Таблице 2** и/или в **Таблице 4**, в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также охватываются настоящим изобретением, как и способы получения антител путем культивирования указанных клеток-хозяев в условиях, позволяющих получать антитела и выделять полученные антитела.

[0028] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, в которых любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают CD28, объединен, связан или иным образом ассоциирован с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают MUC16, с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD28 и MUC16.

[0029] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. Для некоторых областей применения может быть полезной модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозный фрагмент, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733). Для других областей применения может быть осуществлена модификация галактозилирования, чтобы модифицировать комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

[0030] В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16, раскрытую в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, представляющая собой комбинацию биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 и второго терапевтического агента. В одном из вариантов реализации указанный второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который предпочтительно комбинируют с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой против CD28/MUC16. Типичные агенты, которые можно предпочтительно комбинировать с биспецифичной антигенсвязывающей молекулой против CD28/MUC16, подробно рассмотрены в других местах в настоящем документе.

[0031] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, с применением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению, причем указанные терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции,

содержащий биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту.

[0032] Настоящее изобретение также включает применение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией MUC16 или вызванного ею.

[0033] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, с применением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению, причем указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16 комбинируют с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (*например*, анти-CD28/анти-MUC16 в комбинации с антителами к CD3/MUC16).

[0034] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, с применением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению, причем указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16 комбинируют с ингибитором контрольной точки, нацеленным, *например*, на PD-1, PD-L1 или CTLA-4 (*например*, анти-CD28/анти-MUC16 в комбинации с антителами к PD-1). В определенных вариантах реализации предусмотрено, что антитела к CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на PD-1, такими как пембролизумаб (Keytruda[®]), ниволумаб (Opdivo[®]) или цемиплимаб (Libtayo[®]). В определенных вариантах реализации предусмотрено, что антитела к CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на PD-L1, такими как атезолизумаб (Tecentriq[®]), авелумаб (Bavencio[®]) или дурвалумаб (Imfinzi[®]). В определенных вариантах реализации предусмотрено, что антитела к CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно комбинировать с агентами, нацеленными на CTLA-4, такими как ипилимумаб (Yervoy[®]).

[0035] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены терапевтические способы нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, с применением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению, причем указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16 комбинируют с другими противоопухолевыми биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, которые связываются с CD3 (*например*, анти-CD28/анти-MUC16 в комбинации с биспецифичными антителами к CD3/MUC16), и ингибитором контрольной точки, нацеленным на PD-1, PDL-1 или CTLA-4 (*например*, анти-CD28/анти-MUC16 в комбинации с антителами к PD-1).

[0036] Другие варианты реализации будут очевидны из обзора следующего подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0037] **Фигура 1** представляет собой график, показывающий ингибирование роста опухоли в искусственно сконструированных линиях клеток с введенной экспрессией костимулирующего лиганда. Три линии опухолевых клеток, B16F10.9, EL4 и MC38, искусственно конструировали для экспрессии костимулирующего лиганда или GFP, или пустого вектора в качестве контроля. Искусственно сконструированные опухолевые клетки вводили путем инъекции мышам C57BL/6. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС). Данные являются репрезентативными по меньшей мере для одного эксперимента с пятью (5) мышами на группу.

Рост опухоли показан на графике как процент от контроля, рассчитанный как

$$\frac{\text{Объем опухоли}}{\text{Объем опухоли контроля}} \times 100$$

[0038] **Фигуры 2А-2I** представляют собой схематические изображения и графики, показывающие, что типичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению усиливают действие Т-клеток в присутствии стимуляции TCR с помощью антитела к MUC16хCD3 и линий раковых клеток с эндогенным MUC16 (PEO1). **Фигуры 2В-2Е** представляют собой графики, показывающие данные для МКПК человека. **Фигуры 2F-2Н** представляют собой графики, показывающие данные для МКПК яванской макаки. Т-клетки человека (для **Фигур 2В-2Е**) или Т-клетки яванской макаки (для **Фигур 2F-2Н**) культивировали с раковыми клетками-мишенями с эндогенной экспрессией MUC16 (линия рака яичников PEO-1) и указанными биспецифичными антителами в течение 96 часов.

[0039] **Фигура 2А** представляет собой схему аналитического процесса.

[0040] **Фигура 2В** представляет собой график, показывающий уничтожение опухолевых клеток. Значение по оси Y относится к доле жизнеспособных клеток PEO1.

[0041] **Фигура 2С** представляет собой график, показывающий высвобождение IFN γ .

[0042] **Фигура 2D** представляет собой график, показывающий количество CD4 Т-клеток и частоту CD25⁺ клеток, представленную как процент CD25⁺ клеток в CD4 Т-клетках.

[0043] **Фигура 2Е** представляет собой график, показывающий количество CD8 Т-клеток и частоту CD25⁺ клеток, представленную как процент CD25⁺ клеток в CD8 Т-клетках.

[0044] **Фигура 2F** представляет собой график, показывающий уничтожение опухолевых клеток. Значение по оси Y относится к доле жизнеспособных клеток PEO1.

[0045] **Фигура 2G** представляет собой график, показывающий количество CD4 Т-клеток и частоту CD25⁺ клеток, представленную как процент CD25⁺ клеток в CD4 Т-клетках.

[0046] **Фигура 2Н** представляет собой график, показывающий количество CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток и частоту CD25⁺ клеток, представленную как процент CD25⁺ клеток в CD4 Т-клетках и CD8 Т-клетках.

[0047] **Фигура 2I** представляет собой график, показывающий связывание антитела с клеточными мишенями, измеренное с помощью проточной цитометрии.

[0048] **Фигуры 3А-3С** представляют собой графики, показывающие, что типичные биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению усиливают противоопухолевый иммунитет за счет активации Т-клеток, индуцированной антителами к MUC16хCD3.

[0049] **Фигура 3А** представляет собой график, показывающий опухолевую нагрузку, измеренную по средней яркости (средняя яркость [ф/с/см²/ср] в зависимости от времени. Значения представляют собой медианное значение группы плюс диапазон. Значения Р были рассчитаны с помощью критерия Манна-Уитни для каждой временной точки. *, p<0,05 или **, p<0,01 для сравнения MUC16хCD3 и EGFRvIIIхCD3. ##, p<0,01 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3. Мышам NSG с привитыми МКПК человека имплантировали OVCAR3-Luc путем внутрибрюшинной инъекции. Мыши получали внутривенные (в/в) инъекции в Дни 5 и 8 (стрелки). Мыши получали либо 2,5 мкг MUC16хCD3, либо 2,5 мкг EGFRvIIIхCD3. Некоторым мышам также вводили MUC16хCD28 в дозе 100 мкг. Опухолевую нагрузку оценивали с помощью BLI в Дни 4, 8, 12, 15, 20 и 25 после имплантации опухоли путем мониторинга биолюминесценции в зависимости от времени. N=5 мышей на группу

[0050] **Фигура 3В** представляет графики, показывающие уровни цитокинов в сыворотке из крови, полученной через 4 часа после введения первой дозы в тех же экспериментах, что и показанные на **Фигуре 3А**. Значения Р были рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа. ##, p<0,01 или #####, p<0,0001 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3. @@@, p<0,005 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и MUC16хCD3. ^, p<0,01, ^^, p<0,005, ^^^^P<0,0001 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3+MUC16хCD28.

[0051] **Фигура 3С** представляет графики, показывающие опухолевую нагрузку и корреляцию с уровнями СА-125 в сыворотке на день 26. N=5 мышей на группу из тех же экспериментов, что и показанные на **Фигуре 3А**.

[0052] **Фигура 4А** представляет собой график, показывающий опухолевую нагрузку, измеренную по средней яркости (средняя яркость [ф/с/см²/ср] в зависимости от времени. Значения представляют собой медианное значение группы плюс диапазон. Значения Р были рассчитаны с помощью критерия Манна-Уитни для каждой временной точки. **, p<0,01 для сравнения MUC16хCD3 и EGFRvIIIхCD3. ##, p<0,01 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3. @, p<0,05 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и MUC16хCD3. Мышам NSG с привитыми МКПК человека имплантировали OVCAR3-Luc путем внутрибрюшинной инъекции. Мыши получали в/в 0,5 мг/кг MUC16хCD3 или 0,5 мг/кг EGFRvIIIхCD3. Некоторым мышам также вводили

MUC16хCD28 в дозе 0,2 мг/кг в Дни 5 и 8 (стрелки). Опухолевую нагрузку оценивали с помощью BLI в Дни 4, 8, 11, 14, 21, 28 и 34 путем мониторинга биолюминесценции в зависимости от времени. N=5 или 6 мышей на группу.

[0053] **Фигура 4В** представляет графики, показывающие уровни цитокинов в сыворотке из крови, полученной через 4 часа после введения первой дозы в тех же экспериментах, что и показанные на **Фигуре 4А**. Значения Р были рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа. *, $p < 0,05$ для сравнения MUC16хCD3 и EGFRvIIIхCD3 ##, $p < 0,01$ или ###, $p < 0,001$ или ####, $p < 0,0001$ для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3. @, $p < 0,05$ или @@@@, $p < 0,0001$ для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и MUC16хCD3. ^^, $p < 0,001$ или ^^P<0,001 или ^^P<0,0001 для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3+MUC16хCD28.

[0054] **Фигура 5** представляет собой график, показывающий выживаемость в зависимости от времени. Клетки ID8-VEGF/hMUC16 имплантировали в брюшную полость мышей, гуманизированных по hCD3/hCD28/hMUC16. Мыши получали внутривенно EGFRvIIIхCD3 или MUC16хCD3 в дозе 1 мг/кг или в Дни 3, 6 и 10 после имплантации опухоли, как указано стрелками. Некоторым мышам также вводили MUC16хCD28 в дозе 1 мг/кг. Значения Р были рассчитаны с помощью критерия Мантела-Кокса для каждой временной точки. **, $p < 0,01$ для сравнения MUC16хCD3 и EGFRvIIIхCD3. ##, $p < 0,01$ для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и EGFRvIIIхCD3. @, $p < 0,05$ для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и MUC16хCD3.

[0055] **Фигура 6А** представляет собой график, показывающий объем опухоли в зависимости от времени. Опухолевые клетки MC38/hMUC16 имплантировали подкожно мышам, гуманизированным по hCD3/hMUC16. Мыши получали антитело к MUC16хCD3 в дозе 0,01 мг/кг, типичное биспецифичное антитело к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению в дозе 0,5 мг/кг, как указано, два раза в неделю, начиная со дня 0 (стрелки). Объем опухоли контролировали с течением времени путем измерения с помощью штангенциркуля. Показанные значения представляют собой среднее значение $\pm$ СОС. Данные являются репрезентативными для трех (3) экспериментов. N=7 мышей на группу. Значения Р были рассчитаны с помощью двухфакторного дисперсионного анализа в сравнении с изотипическим контролем (**, $p < 0,01$ и ****, $P < 0,0001$ для сравнения MUC16хCD3+MUC16хCD28 и изотипического контроля; #, $p < 0,05$ для сравнения MUC16хCD3 и изотипического контроля; \$, $p < 0,05$ для сравнения MUC16хCD28 и изотипического контроля).

[0056] **Фигура 6В** представляет графики, показывающие уровни цитокинов в сыворотке из крови, полученной в указанной временной точке, из тех же экспериментов, что и показанные на **Фигуре 6А**.

[0057] **Фигуры 6С и 6Д** представляют собой графики, показывающие уровни цитокинов. У мышей брали кровь для определения уровней цитокинов в сыворотке через 4 часа после введения дозы в день 7. Статистическую значимость рассчитывали с помощью

однофакторного дисперсионного анализа в сравнении с изотипом $**p<0,01$ и $****p<0,0001$. $n=7$ мышей на группу. Данные относятся к 3 экспериментам.

[0058] **Фигура 7** представляет собой график, показывающий, что закрепление MUC16хCD28 на аналитических планшетах с использованием метода сухого покрытия или влажного покрытия не индуцирует активацию Т-клеток в отсутствие стимула CD3, в отличие от суперагониста к CD28.

[0059] **Фигуры 8А-8С** представляют собой графики, показывающие, что MUC16хCD28 по отдельности или в виде комбинированной терапии не индуцирует системную активацию Т-клеток. Яванские макаки получали биспецифики в однократной дозе 1 или 10 мг/кг (указано в скобках). Дополнительная группа получила в общей сложности 4 дозы, указанные как повторное дозирование. Кровь собирали в указанных временных точках после введения дозы (ч). **Фигура 8А**: Показаны цитокины сыворотки, **Фигура 8В**: Показано относительное количество Т-клеток и **Фигура 8С**: Показана частота Ki67⁺ и ICOS⁺ Т-клеток (% от CD3). Данные представляют собой среднее значение $\pm$ СОС. $N=3$ животных на группу. Значения Р рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа в сравнении с изотипическим контролем. ($**$, $p<0,01$; $***$, $p<0,001$ и $****$, $p<0,0001$).

[0060] **Фигуры 9А и 9В** показывают, что биспецифичные антитела к MUCхCD28 и MUC16хCD3 могут связываться с MUC-экспрессирующими клетками в присутствии растворимого СА-125. Клетки OVCAR-3 инкубировали в 8 нМ указанных антител, меченных Alexa647, в присутствии возрастающих концентраций растворимого СА-125 (**Фигура 9А**) или MUC16 nub (**Фигура 9В**) в течение 30 минут при 4°C в буфере для проточной цитометрии (ФСБ+1% ФБС). После инкубации клетки промывали буфером для проточной цитометрии и анализировали методом проточной цитометрии.

[0061] **Фигура 10** представляет собой схему клеточного репортерного биотеста на основе Т-клеток/антигенпрезентирующих клеток.

[0062] **Фигуры 11А и 11В** показывают, что bs24963D (также упоминаемый как REGN5668) усиливает передачу сигнала NF- κ B в модифицированных Т-клетках в присутствии стимулирующих антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих MUC16. В общих чертах, репортерные клетки J.RT3.T3.5/NF- κ B-Luc/1G4AB/hCD8 α β /hCD28 инкубировали с bs24963D или несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28 (не-ТААхCD28) в диапазоне концентраций (от 39 пМ до 10 нМ), включая контроль без антитела, в присутствии клеток 3Т3/h β 2М/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16 (**Фигура 11А**) и 3Т3/h β 2М/HLA-A2/NYESO1p при соотношении репортерных клеток и стимулирующих клеток 3Т3 3,33:1 (**Фигура 11В**). Передачу сигнала NF- κ B детектировали как активность люциферазы и измеряли путем количественной оценки сигнала люминесценции, выраженного в виде относительных световых единиц (RLU). Данные анализа, выполненного в лунках с двумя повторами, нанесены на график как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (СО).

[0063] **Фигура 12** показывает, что bs24963D (также упоминаемый как REGN5668) опосредует зависимое от концентрации высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека в присутствии REGN4018 (см. WO2017/053856A1, BSMUC16/CD3-001, который представляет собой REGN4018) с клетками-мишенями OVCAR-3 и PEO1. В общих чертах, обогащенные первичные Т-клетки человека инкубировали с bs24963D или несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28 (не-TAAxCD28) в диапазоне концентраций (от 7,6 пМ до 500 нМ), включая контроль без антитела, в присутствии фиксированной концентрации (5 нМ) либо REGN4018, либо несоединяющего контрольного биспецифичного антитела к CD3 (не-TAAxCD3) и линий клеток рака яичников человека OVCAR-3 или PEO1 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 10:1 или 4:1, соответственно. Данные получены из анализа, выполненного в лунках с тремя повторами, и нанесены на график как среднее значение $\pm$ СО. Высвобождение IL-2 измеряли с использованием иммуноанализа IL-2 человека в соответствии с протоколом производителя.

[0064] **Фигура 13** показывает, что bs24963D (также упоминаемый как REGN5668) опосредует зависимое от концентрации усиление пролиферации первичных Т-клеток человека в присутствии REGN4018 с клетками-мишенями OVCAR-3 и PEO1. В общих чертах, обогащенные первичные Т-клетки человека инкубировали с bs24963D или несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28 (не-TAAxCD28) в диапазоне концентраций (от 7,6 пМ до 500 нМ), включая контроль без антитела, в присутствии фиксированной концентрации (5 нМ) либо REGN4018, либо несоединяющего контрольного биспецифичного антитела к CD3 (не-TAAxCD3) и линий клеток рака яичников человека OVCAR-3 и PEO1 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 10:1 или 4:1, соответственно. Данные получены из анализа, выполненного в лунках с тремя повторами, и нанесены на график как среднее значение $\pm$ СО. Пролиферацию Т-клеток измеряли посредством детектирования распада трития (из меченого тритием тимидина, включенного в делящиеся клетки) и представляли как количество импульсов в минуту (имп./мин).

[0065] **Фигура 14** показывает, что bs24963D (также упоминаемый как REGN5668) опосредует зависимое от концентрации высвобождение IL-2 и что добавление цемиплимаба незначительно увеличивает высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека с клетками-мишенями SW1990 и SW1990/hPD-L1. В общих чертах, обогащенные первичные Т-клетки человека инкубировали с bs24963D или несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28 (не-TAAxCD28) в диапазоне концентраций (от 7,6 пМ до 500 нМ), включая контроль без антитела, в присутствии фиксированной концентрации (20 нМ) либо цемиплимаба, либо контрольного IgG^{4P} и линий клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 и SW1990/hPD-L1 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 2:1. Данные получены из анализа, выполненного в лунках с тремя повторами, и нанесены на график как среднее значение $\pm$ СО. Высвобождение IL-2 измеряли с использованием иммуноанализа IL-2 человека в соответствии с протоколом производителя. Статистические анализы выполняли с использованием двухфакторного

дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. bs24963D+цемиплимаб продемонстрировали статистически значимое увеличение высвобождения IL-2 по сравнению с REGN5668+контрольный IgG4^P в клетках SW1990/hPD-L1 ($p < 0,0001$).

[0066] **Фигура 15** показывает, что bs24963D (также упоминаемый как REGN5668) опосредует зависимое от концентрации усиление пролиферации и что добавление цемиплимаба незначительно увеличивает пролиферацию первичных Т-клеток человека с SW1990 и SW1990/hPD-L1. В общих чертах, обогащенные первичные Т-клетки человека инкубировали с bs24963D или несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28 (не-ТААхCD28) в диапазоне концентраций (от 7,6 пМ до 500 нМ), включая контроль без антитела, в присутствии фиксированной концентрации (20 нМ) либо цемиплимаба, либо контрольного IgG4^P и линий клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 и SW1990/hPD-L1 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 2:1. Данные получены из анализа, выполненного в лунках с тремя повторами, и нанесены на график как среднее значение $\pm$ СО. Пролиферацию Т-клеток измеряли посредством детектирования распада трития (из меченого тритием тимидина, включенного в делящиеся клетки) и представляли как количество импульсов в минуту (имп./мин). Статистические анализы выполняли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. bs24963D+цемиплимаб продемонстрировали статистически значимое увеличение пролиферации по сравнению с bs24963D+контрольный IgG4^P в клетках SW1990/hPD-L1 ($p < 0,0001$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0067] Перед прочтением описания настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными методами и экспериментальными условиями, поскольку такие методы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0068] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В контексте настоящего документа термин «приблизительно» применительно к конкретному приведенному числовому значению означает, что указанное значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте данного документа, выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (*например*, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[0069] Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, предпочтительные методы и материалы описаны

далее. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

Определения

[0070] Выражение «CD28» в контексте настоящего документа относится к антигену, экспрессируемому на Т-клетках в качестве костимулирующего рецептора. CD28 человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, и/или имеет аминокислотную последовательность, представленную под номером доступа NP_006130.1. Эктодомен CD28 человека (N19-P152), имеющий Fc мыши, показан в SEQ ID NO: 52. Эктодомен CD28 человека (N19-P152), имеющий метку мус-мус-his, показан в SEQ ID NO: 53. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат виду, отличному от человека. Таким образом, выражение «CD28» означает CD28 человека, если не указано, что он принадлежит виду, отличному от человека, например, «CD28 мыши», «CD28 обезьяны» и т. д. Эктодомен CD28 мыши (номер доступа NP_031668.3), имеющий метку мус-мус-his, показан в SEQ ID NO: 54.

[0071] В контексте настоящего документа термин «антитело, связывающее CD28» или «антитело к CD28» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают мономерный CD28, а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично распознают димерный CD28. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связывать растворимый CD28 и/или CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности. Растворимый CD28 включает природные белки CD28, а также рекомбинантные варианты белков CD28, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD28, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом не связаны с клеточной мембраной.

[0072] В контексте настоящего документа выражение «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» означает один или более белков CD28, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так, что по меньшей мере часть белка CD28 находится снаружи внеклеточной стороны клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает белки CD28, содержащиеся в контексте функционального Т-клеточного костимулирующего рецептора в мембране клетки. Выражение «CD28, экспрессируемый на поверхности клетки» включает белок CD28, экспрессируемый как часть гомодимера на поверхности клетки. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD28. В качестве альтернативы, «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать или состоять из белка CD28, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD28 человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD28 на своей поверхности.

[0073] В контексте настоящего документа выражение «антитело к CD28» включает как одновалентные антитела с одним видом специфичности, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD28, и второе плечо, которое связывает второй антиген (мишень), причем указанное плечо к CD28 содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в **Таблице 3** в настоящем документе. Примеры биспецифичных антител к CD28 описаны в других местах в настоящем документе. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0074] В контексте настоящего документа термин «MUC16» относится к белку MUC16 человека, если не указано, что он принадлежит виду, не относящемуся к человеку (например, «MUC16 мыши», «MUC16 обезьяны» и т. д.). Белок MUC16 человека имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и/или имеет аминокислотную последовательность, представленную под номером доступа NCBI NP_078966. Ближайший к мембране домен MUC16 человека (P13810-P14451), имеющий метку мус-мус-his, показан как SEQ ID NO: 51.

[0075] В контексте настоящего документа термин «антитело, которое связывает MUC16» или «антитело к MUC16» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут связывать растворимый MUC16 и/или MUC16, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый MUC16 включает природные белки MUC16, а также рекомбинантные варианты белков MUC16, такие как, например, конструкции MUC16, лишенные трансмембранного домена или по иной причине не ассоциированные с клеточной мембраной.

[0076] В контексте настоящего документа выражение «антитело к MUC16» включает как одновалентные антитела с одним видом специфичности, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает MUC16, и второе плечо, которое связывает второй антиген (мишень), причем указанное плечо против MUC16 содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в **Таблице 1** в настоящем документе. Примеры биспецифичных антител к MUC16 описаны в других местах в настоящем документе. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0077] Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифичные антитела.

[0078] Термин «антитело» в контексте настоящего документа означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, CD28). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи - соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную

область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах реализации настоящего изобретения FR антитела к CD28 и/или антитела к MUC16 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

[0079] Термин «антитело» в контексте настоящего документа также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методик молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, присоединения или удаления аминокислот и т. д.

[0080] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), например, пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие искусственно сконструированные

молекулы, такие как доменспецифичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т. д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены акул IgNAR также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего документа.

[0081] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая прилегает к одной или более каркасным последовательностям или находится в рамке считывания с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[0082] В определенных вариантах реализации антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут содержаться в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

[0083] Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моносpezifичными или мультисpezifичными (например, бисpezifичными). Мультисpezifичный антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфично связываться со своим антигеном или с другим эпитопом на том же самом

антигене. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая иллюстративные форматы биспецифичных антител, раскрытые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием рутинных методик, доступных в данной области техники.

[0084] Антитела согласно настоящему изобретению могут выполнять свою функцию посредством комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). «Комплементзависимая цитотоксичность» (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток посредством антитела согласно настоящему изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» (АЗКЦ) относится к клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым приводят к ее лизису. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области техники. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes *et al.*, (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточную цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли для данного антитела опосредовать цитотоксичность.

[0085] В определенных вариантах реализации настоящего изобретения антитела к CD28 и/или антитела к MUC16 согласно настоящему изобретению (моноспецифичные или биспецифичные) представляют собой антитела человека. Подразумевается, что термин «антитело человека» в контексте настоящего документа включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «антитело человека» в контексте настоящего документа не подразумевает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

[0086] Антитела согласно настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах реализации, представлять собой рекомбинантные антитела человека. В контексте настоящего документа термин «рекомбинантное антитело человека» предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антител, экспрессируемых с

использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфецированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., *например*, Taylor et al., 1992, *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295), или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах реализации такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования трансгенного по последовательностям человеческого Ig животного, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственны им, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

[0087] Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с различиями шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[0088] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, не ограничиваясь перечисленным, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить частоту появления второй формы (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека. Данное изобретение охватывает антитела, содержащие одну или более мутаций в областях шарнира, CH2 или CH3, которые могут быть желательны, например, при получении, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[0089] Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело» в контексте настоящего документа означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или извлечено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки,

в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» в контексте настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами реализации выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0090] Настоящее изобретение также включает антитела с одним плечом, связывающие CD28 и/или MUC16. В контексте настоящего документа термин «антитело с одним плечом» означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Антитела с одним плечом согласно настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в **Таблице 1** и **Таблице 3**.

[0091] Антитела к CD28 и/или антитела к MUC16 в настоящем документе или их антигенсвязывающие домены могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антигенсвязывающие белки или антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие домены, полученные из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в которых одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, содержащих одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах реализации все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах реализации только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные

остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было первоначально получено антитело). Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие домены согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко проверены на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т. д. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим образом, охватываются настоящим изобретением.

[0092] Настоящее изобретение также включает антитела к CD28 и/или антитела к MUC16 и антигенсвязывающие молекулы, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные варианты, включенные в данный аспект изобретения, включают варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, содержащие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие молекулы к CD28, 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. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в **Таблице 3** в настоящем документе.

[0093] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические действия. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными

остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0094] Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными инсерциями или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место идентичность нуклеотидных оснований нуклеотидной последовательности, составляющая по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%, при измерении с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как рассмотрено ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по существу идентичная референсной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый указанной референсной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0095] Применительно к полипептидам термин «по существу сходство» или «по существу схожий» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена по существу не приводит к изменению функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24, 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативная

замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0096] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает схожие последовательности, применяя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG, версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами - программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданной и найденной последовательностями (см. Pearson (2000) выше). Еще одним предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы

[0097] Антитела согласно настоящему изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к CD28 и/или антитела к MUC16 согласно настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, в целях получения биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй специфичностью связывания.

[0098] Подразумевается, что использование выражения «антитело к CD28» и/или «антитело к MUC16» в настоящем документе включает как моноспецифичные антитела к

CD28 и/или антитела к MUC16, так и биспецифичные антитела, содержащие CD28-связывающее плечо или MUC16-связывающее плечо и второе плечо, которое связывает антиген-мишень. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает CD28 человека или MUC16 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным в отношении антигена-мишени. Антиген-мишень, с которым связывается другое плечо биспецифичного антитела к CD28 или к MUC16, может представлять собой любой антиген, экспрессируемый на клетке, ткани, органе, микроорганизме или вирусе, против которых необходимо вызвать нацеленный иммунный ответ, или вблизи них. CD28-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в **Таблице 3** в настоящем документе. MUC16-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в **Таблице 1** в настоящем документе. В определенных вариантах реализации CD28-связывающее плечо связывает CD28 человека и индуцирует пролиферацию Т-клеток человека.

[0099] В контексте биспецифичных антител согласно настоящему изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень, указанный антиген-мишень может представлять собой опухолеассоциированный антиген, такой как MUC16.

[00100] В соответствии с определенными типичными вариантами реализации настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают CD28 и MUC16. Такие молекулы могут называться в настоящем документе, *например*, биспецифичными молекулами «анти-CD28/анти-MUC16» или «анти-CD28xMUC16», или «CD28xMUC16», или «анти-MUC16/анти-CD28», или «анти-MUC16xCD28», или «MUC16xCD28», или с использованием другой подобной терминологии.

[00101] В соответствии с определенными примерными вариантами реализации, показанными на **Фигурах**, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (*например*, биспецифичное антитело) могут иметь эффекторное плечо и нацеливающее плечо. Эффекторное плечо может представлять собой первый антигенсвязывающий домен (*например*, антитело к CD28), который связывается с антигенами на эффекторных клетках (*например*, Т-клетках). Нацеливающее плечо может представлять собой второй антигенсвязывающий домен (*например*, антитело к MUC16), который связывается с антигенами на клетках-мишенях (*например*, опухолевых клетках). В соответствии с определенными типичными вариантами реализации эффекторное плечо связывается с CD28, а нацеливающее плечо связывается с MUC16. Биспецифичная молекула против CD28/MUC16 может обеспечивать костимулирующий сигнал для эффекторных клеток (*например*, Т-клеток). Эффекторное плечо неспособно стимулировать Т-клетки в отсутствие кластеризации. При кластеризации эффекторное плечо само по себе незначительно стимулирует Т-клетки. В комбинации с нацеливающим плечом эффекторное

плечо стимулирует Т-клетки. Плечо, нацеленное на опухоль, может иметь несовершенную специфичность к опухоли. Антиген, который является мишенью для нацеливающего плеча (например, MUC16), может экспрессироваться на некоторой доле опухолевых клеток. Специфичность плеча, нацеливающего на опухоль, может быть увеличена путем перекрытия с использованием комбинации с биспецифичными антигенсвязывающими молекулами против CD3 (*например*, биспецифичным антителом к CD3/MUC16).

[00102] В контексте настоящего документа выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарность области (CDR), которая по отдельности или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфично связывается с определенным антигеном. В определенных вариантах реализации антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела в соответствии с определениями этих терминов в других местах в настоящем документе.

[00103] В контексте настоящего 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 сама по себе 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 отличающийся антиген (*например*, MUC16).

[00104] В определенных примерных вариантах реализации настоящего изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающие домены (*например*, биспецифичного антитела), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «D1», а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «D2». Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе D1-HCDR1, D1-HCDR2 и D1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в настоящем документе D2-HCDR1, D2-HCDR2 и D2-HCDR3.

[00105] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть непосредственно или опосредованно связаны друг с другом с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена может быть соединен с отдельным мультимеризующим

доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым обеспечивая образование биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. В контексте настоящего документа термин «мультимеризующий домен» означает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, способные ассоциироваться 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, выбранного из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в группе каждого изоформы.

[00106] Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, будут содержать два мультимеризующих домена, *например*, два Fc-домена, каждый из которых в отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут относиться к одному и тому же изоформу IgG, *например*, к IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В качестве альтернативы, первый и второй мультимеризующие домены могут относиться к разным изоформам IgG, *например*, к IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

[00107] В определенных вариантах реализации мультимеризующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один цистеиновый остаток. В других вариантах реализации мультимеризующий домен представляет собой цистеиновый остаток или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали.

[00108] Для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению может быть использован любой формат биспецифичных антител или технология. Например, антитело или его фрагмент, имеющие первую антигенсвязывающую специфичность, могут быть функционально связаны (*например*, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющими вторую антигенсвязывающую специфичность, в целях получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные типичные биспецифичные форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются перечисленным, *например*, биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (OVO)-Ig, квадрогибридомы, «выступы во впадины», общую легкую цепь (*например*, общую легкую цепь с взаимодействием по типу «выступы во впадины» и т. д.), CrossMab, CrossFab, (SEEO)body, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (OAF)-IgG двойного действия и биспецифичные форматы Mab² (обзор вышеуказанных

форматов см., например, в Klein *et al.* 2012, mAbs 4: 6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки для обзора вышеупомянутых форматов).

[00109] В контексте биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению мультимеризующие домены, *например*, Fc-домены, могут содержать одно или более изменений аминокислот (например, инсерции, делеции или замены) по сравнению со встречающейся в природе версией Fc-домена дикого типа. Например, изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, приводящих к модифицированному Fc-домену, имеющему модифицированное связывающее взаимодействие (*например*, повышенное или пониженное) между Fc и FcRn. В одном из вариантов реализации биспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, причем указанная модификация увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где pH составляет от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (*например*, E или Q); 250 и 428 (*например*, L или F); 252 (*например*, LN/FIW или T), 254 (*например*, S или T) и 256 (*например*, S/R/Q/EID или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (*например*, UR/S/P/Q или K) и/или 434 (*например*, H/F или V); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов реализации модификация включает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S); модификацию 428L, 2591 (*например*, V2591) и 308F (*например*, V308F); модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (*например*, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P).

[00110] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и причем отличие по меньшей мере в одной аминокислоте снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, не имеющим отличия в аминокислоте. В одном из вариантов реализации первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; согласно Y436F EU). Другие модификации, которые могут содержаться во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V821 (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V4221 согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V821 (IMGT; N384S, K392N и V4221 согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V821 (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V4221 согласно EU) в случае антител IgG4.

[00111] В определенных вариантах реализации Fc-домен может быть химерным и содержать комбинацию последовательностей Fc, полученных более чем от одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный Fc-домен может содержать часть или всю последовательность C_H2, полученную из области C_H2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный Fc-домен может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью, полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит, от N- к C-концу: [IgG4 C_H1] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG4 C_H3]. Еще один пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, содержит, от N- к C-концу: [IgG1 C_H1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG1 C_H3]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, описаны в заявке WO2014/022540 A1. Химерные Fc-домены, имеющие такое общее строение, и их варианты могут обладать измененным связыванием с Fc-рецептором, которое, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

Варианты последовательностей

[00112] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в которых одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с

раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, содержащих одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах реализации все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах реализации только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, *например*, только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (*т.е.* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, *например*, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко проверены на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т. д. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных по этому общему принципу, охватываются настоящим изобретением.

[00113] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, где один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, содержащие 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. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим

боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена по существу не приводит к изменению функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00114] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность HCVR, LCVR и/или CDR, по существу идентичную любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к аминокислотной последовательности означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24, 307-331.

[00115] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает схожие последовательности, применяя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по

умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG, версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами - программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданной и найденной последовательностями (см. Pearson (2000) выше). Еще одним предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

pH-зависимое связывание

[00116] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16 с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело к CD28 согласно настоящему изобретению может демонстрировать пониженное связывание с CD28 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В качестве альтернативы, антитела к MUC16 согласно настоящему изобретению могут проявлять повышенное связывание с MUC16 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает значения pH менее приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. В контексте настоящего документа выражение «нейтральный pH» означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный pH» включает значения pH, равные приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[00117] В определенных случаях «пониженное связывание... при кислом pH по сравнению с нейтральным pH» выражается посредством отношения значения K_D связывания антитела с его антигеном при кислом pH к значению K_D связывания антитела с его антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие «пониженное связывание с CD28 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH» в контексте настоящего изобретения, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют отношение кислой/нейтральной K_D равное приблизительно 3,0 или более. В определенных типичных вариантах реализации отношение кислой/нейтральной K_D для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

[00118] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, *например*, путем скрининга популяции антител на предмет пониженного (или повышенного) связывания с определенным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего домена (*например*, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

Антитела, содержащие варианты Fc

[00119] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые повышают или понижают связывание антитела с рецептором FcRn, *например*, при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие молекулы, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, где мутация(ии) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где рН составляет от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (*например*, E или Q); 250 и 428 (*например*, L или F); 252 (*например*, L/Y/F/W или T), 254 (*например*, S или T) и 256 (*например*, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (*например*, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (*например*, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F) и 434. В одном варианте реализации модификация включает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S); модификацию 428L, 259I (*например*, V259I) и 308F (*например*, V308F); модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (*например*, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P).

[00120] Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (*например*, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (*например*, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (*например*, M428L и N434S); и 433K и 434F (*например*, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антитела, раскрытых в настоящем документе, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и антигенсвязывающих молекул

[00121] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 и/или MUC16 человека с высокой аффинностью.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 и/или MUC16 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных требуемых свойств нацеливания. Например, в контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD28, а другое плечо связывает антиген-мишень (*например*, MUC16), может быть желательно, чтобы плечо, связывающее антиген-мишень, связывало антиген-мишень с высокой аффинностью, в то время как плечо против CD28 связывало CD28 только с умеренной или низкой аффинностью. Таким образом, может быть достигнуто избирательное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, при одновременном предотвращении неизбирательного/нецелевого связывания CD28 и ассоциированных с этим последующих нежелательных побочных эффектов.

[00122] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD28 человека (*например*, при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 165 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 4 в настоящем документе. В определенных вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD28 с K_D менее чем приблизительно 150 нМ, менее чем приблизительно 130 нМ, менее чем приблизительно 120 нМ, менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ или менее чем приблизительно 30 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 4 в настоящем документе или по существу схожего анализа.

[00123] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 с периодом полужизни для диссоциации ($t_{1/2}$), превышающим приблизительно 2,1 минуты при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 4 в настоящем документе или по существу схожего анализа. В определенных вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD28 с $t_{1/2}$ более чем приблизительно 5 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 200 минут, более чем приблизительно 300 минут, более чем приблизительно 400 минут, более чем приблизительно 500 минут, более чем приблизительно 600 минут, более чем приблизительно 700 минут, более чем приблизительно 800 минут, более чем приблизительно 900 минут, более чем

приблизительно 1000 минут или более чем приблизительно 1200 минут при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 4 в настоящем документе или по существу схожего анализа.

[00124] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (*например*, биспецифичные антитела), способные одновременно связываться с CD28 человека и MUC16 человека. В соответствии с определенными вариантами реализации биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению специфично взаимодействуют с клетками, экспрессирующими CD28 и/или MUC16. Степень, в которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD28 и/или MUC16, может быть оценена методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), как проиллюстрировано в Примере 5 в настоящем документе. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфично связывают клетки человека или яванской макаки, которые экспрессируют CD28, но не MUC16 (*например*, Т-клетки), и линии клеток карциномы яичников человека, которые экспрессируют MUC16, но не CD28 (*например*, OVCAR-3 или PEO1). Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, связывающие любые из вышеупомянутых клеток и линий клеток со значением $ЭК_{50}$ от приблизительно $9,2 \times 10^{-6}$ до приблизительно $2,8 \times 10^{-10}$ М или менее, определенным с использованием анализа методом FACS согласно Примеру 4 или по существу схожего анализа.

[00125] Настоящее изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам против CD28/MUC16, которые индуцируют или увеличивают опосредуемое Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD28xMUC16, которые индуцируют или увеличивают опосредуемое Т-клетками уничтожение опухолевых клеток с $ЭК_{50}$ менее чем приблизительно 392 пМ, измеренной в анализе опосредуемого Т-клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 7 в настоящем документе (*например*, оценки степени уничтожения опухолевых клеток PEO1 с помощью МКПК человека или яванской макаки в присутствии антител к CD28xMUC16) или по существу схожего анализа. В определенных вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют опосредуемое Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (*например*, опосредуемое МКПК уничтожение клеток PEO1) со значением $ЭК_{50}$ менее чем приблизительно 200 пМ, 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, менее чем приблизительно 1,5 пМ или менее чем приблизительно 1,45 пМ, измеренной в анализе опосредуемого Т-

клетками уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, *например*, с использованием формата анализа согласно Примеру 7 в настоящем документе или по существу схожего анализа.

[00126] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, которые связываются с CD28-экспрессирующими Т-клетками человека или яванской макаки со значением ЭК₅₀ от 1,0 пМ до 10 мкМ. В определенных вариантах реализации биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16 связываются с CD28-экспрессирующими Т-клетками человека или яванской макаки со значением ЭК₅₀ от 9,2 мкМ до 120 нМ. Например, настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, которые связываются с CD28-экспрессирующими Т-клетками человека со значением ЭК₅₀ приблизительно 1 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 20 нМ, приблизительно 30 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 90 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 300 нМ, приблизительно 500 нМ, приблизительно 800 нМ, приблизительно 1000 нМ, приблизительно 2 мкМ, приблизительно 4 мкМ, приблизительно 6 мкМ, приблизительно 8 мкМ, приблизительно 10 мкМ или более.

[00127] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, которые проявляют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (а) активации Т-клеток, индукции высвобождения IL-2 и положительной регуляции CD25⁺ и PD-1 в МКПК человека (*см.*, *например*, Примеры 6 и 7 в настоящем документе); (b) повышения цитотоксичности, опосредуемой Т-клетками человека или яванской макаки, в отношении линий клеток, экспрессирующих MUC16 (*см.*, *например*, Пример 7 в настоящем документе); (с) индукции цитотоксичности, опосредуемой наивными Т-клетками приматов, в отношении линий клеток, экспрессирующих MUC16 (*см.*, *например*, Пример 7 в настоящем документе); (е) истощения опухолевых клеток у мышей (*например*, Пример 8 в настоящем документе); (f) повышения устранения опухоли у мышей (*например*, Пример 8 в настоящем документе); (g) отсутствия индукции системной активации Т-клеток у яванских макак.

[00128] Настоящее изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, способные истощать пул опухолевых клеток у субъекта (*см.*, *например*, Пример 9). Например, в соответствии с определенными вариантами реализации предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, причем двукратное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы субъекту (*например*, в дозе приблизительно 5,0 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг или менее) вызывает уменьшение количества опухолевых клеток у субъекта. В соответствии с определенными вариантами реализации предложены

биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16, причем двукратное введение указанных биспецифичных антигенсвязывающих молекул субъекту (*например*, в дозе приблизительно 2500 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг или менее) вызывает уменьшение количества опухолевых клеток у указанного субъекта.

Картирование эпитопа и связанные технологии

[00129] Эпитоп на CD28 или MUC16, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD28 или белка MUC16. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD28 или MUC16. Антитела согласно настоящему изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в мономере CD28, или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух разных цепях CD28 димера CD28. Термин «эпитоп» в контексте настоящего документа относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические действия. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[00130] Различные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения того, «взаимодействует ли с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке антигенсвязывающий домен антитела. Типичные методики, которые могут быть использованы для определения эпитопа или связывающего домена определенного антитела или антигенсвязывающего домена, включают, *например*, стандартный перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), точечный мутагенез (*например*, мутагенез с аланиновым сканированием, мутагенез с аргининовым сканированием и т. д.), блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), анализ с защитой от протеаз и анализ с использованием расщепления пептидов. Кроме того, могут быть использованы такие методы как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Еще одним методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, детектируемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах,

метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить протекание водородно-дейтериевого обмена на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгенодифракционный анализ кристаллической структуры также может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело.

[00131] Настоящее изобретение дополнительно включает антитела к CD28 и к MUC16, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных примерных антител, описанных в настоящем документе (*например*, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, представленных в **Таблице 1** и **3** в настоящем документе). Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела к CD28 и/или к MUC16, которые конкурируют за связывание с CD28 и/или MUC16 с любым из конкретных примерных антител, описанных в настоящем документе (*например*, с антителами, содержащими любую из аминокислотных последовательностей, представленных в **Таблице 1** в настоящем документе).

[00132] Настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает MUC16 человека, причем указанный первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD28, что и любой из конкретных примерных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или причем указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на MUC16, что и любой из конкретных примерных MUC16-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

[00133] Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает MUC16 человека, причем указанный первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 с любым из конкретных примерных CD28-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или причем указанный второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 с любым из конкретных примерных MUC16-специфичных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

[00134] Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (*например*, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, что

и референсная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, или конкурирует ли она с ней за связывание, используя стандартные методы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на CD28 (или MUC16), что и референсная биспецифичная антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, указанной референсной биспецифичной молекуле сначала позволяют связываться с белком CD28 (или белком MUC16). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой CD28 (или MUC16). Если тестируемое антитело способно связываться с CD28 (или MUC16) после насыщающего связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом CD28 (или MUC16), отличным от эпитопа, связываемого референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой. С другой стороны, если тестируемое антитело неспособно связываться с молекулой CD28 (или MUC16) после насыщающего связывания с референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD28 (или MUC16), что и эпитоп, связанный референсной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению. Затем может быть проведен дополнительный рутинный эксперимент (*например*, анализы мутаций и связывания пептида) для подтверждения того, связано ли фактически наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела со связыванием с тем же самым эпитопом, что и референсная антигенсвязывающая молекула, или отсутствие наблюдаемого связывания обусловлено стерическим блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого типа могут быть проведены с помощью ELISA, RIA, Вiascore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99% при измерении в анализе конкурентного связывания (см., *например*, Junghans et al., Cancer Res. 1990;50:1495-1502). В качестве альтернативы считают, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Считают, что два антигенсвязывающих белка имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00135] Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, описанную выше методику определения связывания применяют в двух направлениях: в первом направлении

референсной антигенсвязывающей молекуле дают связываться с белком CD28 (или белком MUC16) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD28 (или MUC16). Во втором направлении тестируемому антителу дают связываться с молекулой CD28 (или MUC16) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания референсной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD28 (или MUC16). Если, в обоих направлениях, только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD28 (или MUC16), то делают вывод, что тестируемое антитело и референсная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD28 (или MUC16). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с референсной антигенсвязывающей молекулой, не обязательно должно связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело, но может стерически блокировать связывание референсного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул

[00136] Антигенсвязывающие домены, специфичные к конкретным антигенам, могут быть получены с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфичные в отношении двух разных антигенов (например, CD28 и MUC16), можно соответствующим образом расположить друг относительно друга, используя стандартные методы, с получением биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. (Рассмотрение иллюстративных форматов биспецифичных антител, которые могут применяться для конструирования биспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, приведено в других местах в настоящем документе). В определенных вариантах реализации один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул согласно настоящему 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 согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. Используя технологию VELOCIMMUNE™ (или любую другую технологию получения антител человека), первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью в отношении определенного антигена (*например*, CD28 или MUC16), имеющие переменную область человека и константную область мыши. Определяют характеристики антител и осуществляют их отбор по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышинные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью для создания полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

[00137] Для получения человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул могут быть использованы генетически модифицированные животные. Например, может быть использована генетически модифицированная мышь, неспособная к реаранжировке и экспрессии эндогенной последовательности вариабельной области легкой цепи мышинового иммуноглобулина, при этом мышь экспрессирует только один или два человеческих вариабельных домена легкой цепи, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном мышины константной области каппа в эндогенном мышинном локусе каппа. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, ассоциированные с идентичной легкой цепью, содержащей вариабельный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена человеческой вариабельной области легкой цепи. (Подробное обсуждение таких генетически модифицированных мышей и их использования для получения биспецифичных антигенсвязывающих молекул см., например, в заявке US 2011/0195454).

Биоэквиваленты

[00138] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но сохраняют способность связывать CD28 и/или MUC16. Такие вариантные молекулы содержат одно или более присоединений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антигенсвязывающих молекул. Аналогичным образом, последовательности ДНК согласно настоящему изобретению, кодирующие антигенсвязывающие молекулы, охватывают последовательности, содержащие одно или более присоединений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антигенсвязывающую молекулу, которая по существу биоэквивалентна описанным антигенсвязывающим молекулам согласно настоящему изобретению. Примеры таких вариантных аминокислотных и ДНК-последовательностей рассмотрены выше.

[00139] Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, биоэквивалентные любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе, так и в многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не имеют

существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, *например*, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[00140] В одном из вариантов реализации два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

[00141] В одном из вариантов реализации два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз быть переведен с референсного продукта на биологический продукт и наоборот без ожидаемого увеличения риска побочных действий, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.

[00142] В одном из вариантов реализации два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством одного и того же механизма или механизмов действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

[00143] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Варианты оценки биоэквивалентности включают, *например*, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют динамику концентрации антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости; (b) тест *in vitro*, который был соотнесен с данными о биологической доступности у людей *in vivo* и позволяет в разумных пределах их прогнозировать; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором измеряют динамику соответствующего немедленного фармакологического действия антитела (или его мишени); и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

[00144] Биоэквивалентные варианты иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, с помощью различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, могут быть подвергнуты делеции или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать примерные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем документе, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые устраняют или убирают гликозилирование.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами

[00145] Согласно настоящему изобретению, в соответствии с определенными вариантами реализации, предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека, но не с CD28 из других видов. Согласно настоящему изобретению также предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с MUC16 человека, но не с MUC16 из других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и с CD28 из одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с MUC16 человека и с MUC16 из одного или более видов, отличных от человека.

[00146] В соответствии с определенными типичными вариантами реализации настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и/или MUC16 человека, и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из CD28 и/или MUC16 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванской макаки, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Например, в конкретном типичном варианте реализации настоящего изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD28 человека и CD28 яванской макаки, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16 человека.

Иммуноконъюгаты

[00147] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, разрушающий клетки. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, WO 05/103081).

Терапевтический состав и введение

[00148] Согласно настоящему изобретению предложены фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа «масло в воде» и «вода в масле», эмульсии на основе карбовакса

(полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00149] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, подлежащего лечению заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. При применении биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению в терапевтических целях у взрослого пациента может быть предпочтительным внутривенное введение биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению обычно в разовой дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозировки и схемы введения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы могут быть определены опытным путем; например, можно контролировать течение заболевания пациента путем периодического обследования и корректировать дозу соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование дозировок может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области техники способов (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00150] Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, *например*, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредуемый рецепторами эндоцитоз (см., *например*, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композиция может быть введена любым удобным путем, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные покровы (*например*, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.) и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

[00151] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению весьма подходящим является шприц-ручка. Такой шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции из картриджа и его опустошения

пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть использован повторно. В одноразовом шприце-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовый шприц-ручка приходит уже заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции устройство выбрасывают целиком.

[00152] Множество многоразовых шприцев-ручек и шприцев-тюбиков подходит для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и другие. Примеры одноразовых шприцев-ручек, подходящих для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), шприц-ручку PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и другие.

[00153] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте реализации может быть использован насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте реализации могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте реализации система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, в результате чего требуется только доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[00154] Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т. д. Эти инъекционные формы могут быть получены с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные формы могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие

вспомогательные агенты и т. д., которые могут быть использованы в сочетании с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (*например*, этанол), многоатомный спирт (*например*, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [*например*, полисорбат 80, НСО-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые могут быть использованы в сочетании с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

[00155] Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственных формах в единичной дозе, выбранной таким образом, чтобы она вмещала дозу активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Содержащееся количество вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; предпочтительно, особенно в форме инъекции, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Виды терапевтического применения антигенсвязывающих молекул

[00156] Настоящее изобретение включает способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антитело к CD28 или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает CD28 и антиген-мишень (*например*, MUC16). Указанная терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В контексте настоящего документа выражение «нуждающийся в этом субъект» означает человека или животное, отличное от человека, которые проявляют один или более симптомов или признаков рака (*например*, субъект с признаками опухоли или страдающий любым из видов рака, упомянутых ниже в настоящем документе), или которые иным образом получили бы пользу от ингибирования или снижения активности MUC16 или истощения пула MUC16⁺ клеток.

[00157] Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) пригодны, *среди прочего*, для лечения любого заболевания или расстройства, при котором может оказать благоприятное действие стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа. В частности, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы против CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью MUC16 или пролиферацией MUC16⁺ клеток, или опосредуемого ими.

Механизм действия, посредством которого осуществляются терапевтические способы согласно настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих MUC16, в присутствии эффекторных клеток, например, Т-клеток. Клетки, экспрессирующие MUC16, для ингибирования или уничтожения которых можно применять биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, включают, например, онкогенные клетки яичника.

[00158] Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, *например*, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих при раке ободочной кишки, легкого, молочной железы, почки и подтипах рака мочевого пузыря. В соответствии с определенными вариантами реализации биспецифичные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению применяют для лечения рака яичников.

[00159] Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. В контексте настоящего документа термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после проведения противораковой терапии.

[00160] В соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения предложены способы лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией MUC16 (*например*, MUC16-экспрессирующего рака, такого как рак яичников), включающие введение субъекту одной или более биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в других местах настоящего документа, после того, как было показано, что указанный субъект не отвечает на другие типы разных видов противораковой терапии. Например, настоящее изобретение включает способы лечения рака яичников, включающие введение пациенту биспецифичной антигенсвязывающей молекулы против CD28/MUC16 через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил стандартное лечение для пациентов, страдающих раком, *например*, раком яичников. В других аспектах биспецифичную антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению (биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16), содержащую Fc-домен IgG4, первоначально вводят субъекту в один или более моментов времени (*например*, чтобы обеспечить устойчивое начальное истощение пула клеток рака яичников) с последующим введением эквивалентной биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей другой домен IgG, такой как Fc-домен IgG1, в последующие моменты времени. Предусмотрено, что антитела к CD28/MUC16 согласно настоящему изобретению можно применять в сочетании с другими биспецифичными антигенсвязывающими молекулами, такими как биспецифичное антитело к MUC16/CD3. Также предусмотрено, что биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению будут применять в сочетании с ингибиторами контрольной точки, например, нацеленными на PD-1 и CTLA-4, и другие мишени. Применение комбинации двух биспецифичных антител, нацеленных на один и тот же опухолевый антиген (*например*, MUC16), может

обеспечить преимущества, но при этом один из биспецификов должен быть нацелен на CD3 на Т-клетках, а другой биспецифик должен быть нацелен на молекулу костимулятора, такую как CD28. Эта комбинация может применяться самостоятельно для усиления уничтожения опухолевых клеток или может применяться в комбинации с ингибитором контрольной точки.

[00161] Типичные виды MUC16-экспрессирующего рака, включают, но не ограничиваются ими, рак яичников, рак молочной железы, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, внутриспеченочную холангиокарциному в массивной форме, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочно-кишечного тракта.

Комбинированные терапии и составы

[00162] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любые из иллюстративных антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

[00163] Типичные дополнительные терапевтические агенты, которые можно комбинировать или которые можно вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, включают, *например*, химиотерапию, радиационную терапию, ингибиторы контрольных точек, нацеленные на PD-1 (*например*, антитело к PD-1, такое как пембролизумаб, ниволумаб или цемиплимаб; (см. US9987500)), CTLA-4, LAG3, TIM3 и другие, костимулирующие агонистические двухвалентные антитела, нацеленные на такие молекулы как GITR, OX40, 4-1BB и другие), биспецифичные антитела к CD3 (см., например, WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 и WO2018/058001A1), другие антитела, нацеленные на MUC16хCD3 (см., например, WO2017/053856A1), и другие костимулирующие биспецифичные антитела к CD28.

[00164] Другие агенты, которые могут оказать благоприятное действие при введении в комбинации с антителами согласно настоящему изобретению, включают, *например*, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению (*например*, фармацевтические композиции, содержащие биспецифичную антигенсвязывающую молекулу против CD28/MUC16, раскрытую в настоящем документе) также могут быть введены как часть терапевтической схемы, содержащей 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[®], цитозин-арабинозид, ara-C), цисплатин (*например*,

Platinol®-AQ); и «ESHAP»: этопозид (*например*, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (*например*, Medrol®), высокие дозы цитарабина, цисплатин (*например*, Platinol®-AQ).

[00165] Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в настоящем документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, кшРНК, пептитело, нанотело или фрагмент антитела (*например*, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')₂; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению также могут быть введены и/или включены в состав комбинированного препарата с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВП (нестероидными противовоспалительными препаратами). Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению также могут быть введены как часть схемы лечения, которая также включает радиационную терапию и/или традиционную химиотерапию, или лечение биологическим препаратом, включая ингибиторы контрольных точек или другие биспецифичные антитела.

[00166] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CytosanTM); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметиломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногамицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрекстат; аналоги

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

[00167] Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению (в контексте настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[00168] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержится в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других местах в настоящем документе.

Схемы введения

[00169] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения несколько доз антигенсвязывающей молекулы (*например*, антитела к CD28 или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфично связывает MUC16 и CD28) могут быть введены субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего документа под «последовательным введением» подразумевается, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в другой момент времени, *например*, в разные дни с заданным промежутком (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, включающие последовательное введение пациенту разовой начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующими одной или более вторичными дозами указанной антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, с последующими одной или более третичными дозами указанной антигенсвязывающей молекулы.

[00170] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы все могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В определенных вариантах реализации, однако, количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, различается между указанными дозами (*например*, скорректировано в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в течение курса лечения. В определенных вариантах реализации две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде «ударных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводят реже (*например*, «поддерживающие дозы»).

[00171] В одном типичном варианте реализации настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (*например*, через 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза» в контексте настоящего документа означает, в последовательности многократных введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00172] Способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (*например*, антитела к CD28 или биспецифичной

антигенсвязывающей молекулы, специфично связывающей MUC16 и CD28). Например, в определенных вариантах реализации пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах реализации пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в определенных вариантах реализации пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00173] В вариантах реализации, включающих введение многократных вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах реализации, включающих введение многократных третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы частота, с которой субъекту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьировать в течение курса лечения. Частота введения также может корректироваться лечащим врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[00174] В одном варианте реализации антигенсвязывающую молекулу (например, биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает MUC16 и CD28) вводят субъекту в дозе, рассчитанной на массу тела. «Доза, рассчитанная на массу тела» (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая будет изменяться в зависимости от массы тела субъекта.

[00175] В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят субъекту в виде фиксированной дозы. «Фиксированная доза» (например, доза в мг) означает, что одну дозу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы применяют для всех субъектов, независимо от каких-либо конкретных факторов, связанных с субъектом, таких как масса тела. В одном конкретном варианте реализации фиксированная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению основана на заранее определенной массе тела или возрасте.

[00176] В целом подходящая доза антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению может находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента, обычно в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифичная антигенсвязывающая молекула могут быть введены в 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 однократную дозу. Также подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, являются частью настоящего изобретения.

[00177] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению вводят в виде фиксированной дозы от приблизительно 25 мг до приблизительно 2500 мг. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему 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, 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. Также подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, являются частью настоящего изобретения.

Варианты диагностического применения антител

[00178] Биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для детектирования и/или измерения CD28 или MUC16, или CD28-экспрессирующих, или MUC16-экспрессирующих клеток в образце, *например*, в диагностических целях. Например, антитело к CD28xMUC16 или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося нарушенной экспрессией (*например*, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.) CD28 или MUC16. Примерные диагностические анализы на CD28 или MUC16 могут включать, *например*, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы, немеченое антитело можно применять в диагностических целях в комбинации с вторичным антителом, которое само мечено пригодным для детектирования образом. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные примерные анализы,

которые могут быть использованы для детектирования или измерения CD28 или MUC16 в образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и флуоресцентно-активированную сортировку клеток (FACS). Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах на CD28 или MUC16 согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, который может быть получен от пациента, содержащий поддающиеся детектированию количества белка CD28 или MUC16 или его фрагментов, в нормальных или патологических условиях. Обычно будут измерены уровни CD28 или MUC16 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (*например*, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными уровнями или активностью CD28 или MUC16), для первоначального установления исходного или стандартного уровня CD28 или MUC16. Затем этот исходный уровень CD28 или MUC16 можно сравнить с уровнями CD28 или MUC16, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания или состояния, связанного с CD28 или MUC16.

ПРИМЕРЫ

[00179] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (*например*, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Уровень техники

[00180] Активация Т-клеток инициируется после связывания комплекса Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3 с комплексами пептид-ГКГС («сигнал 1»); затем активация усиливается за счет задействования второго «костимулирующего» рецептора, такого как рецептор CD28 на Т-клетках, связывающегося с его когнатным лигандом(ами) на клетке-мишени («сигнал 2»). Недавно описанные «биспецифичные антитела» на основе CD3 действуют путем замены обычного сигнала 1, связывая Т-клетки с опухолевыми клетками путем связывания опухолеспецифического антигена (TSA) с одним плечом биспецифика и соединения с TCR/CD3 посредством другого плеча. Несмотря на то, что некоторые из так называемых биспецификов TSAxCD3 продемонстрировали многообещающую противоопухолевую эффективность у пациентов, страдающих раком, их активность еще предстоит оптимизировать. Как описано в других местах в настоящем документе, в настоящем изобретении вводится новый класс биспецифичных антител, которые имитируют сигнал 2, соединяя второй TSA с костимулирующим рецептором CD28 на Т-клетках. Данные биспецифичные антитела были названы биспецификами TSAxCD28. Как

описано в настоящем документе, одно примерное антитело согласно настоящему изобретению специфично в отношении антигенов рака яичников (*например*, MUC16). В отличие от суперагонистов к CD28, которые активируют широкий спектр Т-клеток и приводили к выраженной токсичности в ранних клинических исследованиях, данные биспецифики TSAxCD28 проявляют ограниченную активность и не токсичны при использовании по отдельности в моделях на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах или у приматов. Однако, при комбинировании с биспецификами TSAxCD3, примерное антитело согласно настоящему изобретению усиливало искусственный синапс между Т-клеткой и ее клеткой-мишенью, стимулировало активацию Т-клеток и заметно улучшало противоопухолевую активность CD3-биспецификов в ряде моделей ксеногенных и сингенных опухолей. Комбинирование этого нового класса CD28-костимулирующих биспецифичных антител с развивающимся классом биспецификов TSAxCD3 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию виды терапии антителами с потенциально повышенной противоопухолевой эффективностью.

[00181] Способность Т-клеток распознавать и уничтожать свои клеточные мишени, такие как инфицированные вирусом клетки или опухолевые клетки, зависит от согласованного набора взаимодействий. Прежде всего они включают распознавание и связывание клетки-мишени комплексом TCR (который включает связанные γ -, δ -, ϵ -, ζ -цепи CD3); это взаимодействие было названо «сигналом 1» для активации Т-клеток. TCR может распознавать вирусный или опухолевый пептид, презентируемый в бороздке белков ГКГС, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней. Это связывание, как правило, имеет низкую аффинность; поэтому успешный запуск сигнала 1 требует кластеризации многих комплексов TCR вдоль поверхности взаимодействия между Т-клеткой и ее клеткой-мишенью, и эта поверхность взаимодействия была названа иммунным синапсом (J. В. Huppa, M. M. Davis, T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003)). Активация и пролиферация Т-клеток затем дополнительно стимулируются дополнительными взаимодействиями с костимулирующими рецепторами, такими как CD28 («сигнал 2») (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). Когда Т-клетка распознает клетку-мишень посредством комплекса TCR и задействует сигнал 2 посредством связывания CD28 с его когнатным лигандом(ами) (CD80/B7.1 и/или CD86/B7.2) на профессиональной антигенпрезентирующей клетке или клетке-мишени, активация Т-клеток усиливается. Как и в случае с сигналом 1, опосредованный CD28 сигнал 2, вероятно, возникает в результате совместной кластеризации в иммунном синапсе.

[00182] Обычные моноклональные антитела, нацеленные к опухолеспецифическим антигенам (TSA), используют в качестве противоопухолевых терапевтических средств в течение последних двух десятилетий (G. Salles *et al.*, Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther* **34**, 2232-2273 (2017); M. V. Mateos *et al.*, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated

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

эффективности, наблюдаемого для персонализированных видов терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T).

[00183] Одна из причин высокой эффективности разных видов CAR-T-клеточной терапии заключается в том, что химерный антигенный рецептор (CAR) генетически модифицирован для обеспечения как сигнала 1 (за счет части цитодомена CD3z), так и сигнала 2 (например, за счет части цитодомена CD28) при связывании со своей мишенью на опухолевой клетке. Два вида CAR-T-клеточной терапии недавно получили одобрение FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, оба из которых действуют путем связывания антигена CD19 и нацеливания на него (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017)). Подходы с использованием CAR-T-клеток могут быть ассоциированы с тяжелыми нежелательными эффектами, такими как синдром высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичность (S. S. Neelapu *et al.*, Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 47-62 (2018); J. Gust *et al.*, Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* **7**, 1404-1419 (2017); A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018)); и из-за очень персонализированных способов изготовления и требований к предварительному кондиционированию химиотерапевтических схем (S. S. Neelapu *et al.*, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster *et al.*, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017); P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry? *Pharm Res* **35**, 152 (2018)) многие пациенты не считаются подходящими кандидатами.

[00184] Преимущества биспецификов TSAxCD3 как относительно хорошо переносимых и готовых к использованию терапевтических решений для более широких популяций пациентов были бы увеличены, если бы их противоопухолевая активность могла быть дополнительно оптимизирована, особенно если бы это можно было сделать без ущерба для переносимости или, возможно, даже увеличить специфичность к опухолевым клеткам относительно нормальных клеток. С этой целью была выдвинута гипотеза, что применение биспецификов TSAxCD3 в паре с новым классом биспецификов, которые независимо активируют сигнал 2, может обеспечить потенциально повышенную эффективность, а также возможность для увеличения специфичности. Поэтому был разработан второй класс биспецификов. Эти биспецифики могут задействовать либо второй эпитоп на том же опухолеспецифическом антигене, либо второй, отдельный опухолевый антиген, во взаимодействие с костимулирующим рецептором CD28 (биспецифики TSAxCD28), экспрессируемым на Т-клетках. Было высказано предположение, что

комбинирование TSA1xCD3 с TSA2xCD28 должно обеспечить направленную и усиленную имитационную активацию Т-клеток за счет запуска как сигнала 1, так и сигнала 2, со специфичностью, нацеленной только против опухолевых клеток, экспрессирующих оба эпитопа или оба антигена, что обеспечивает более высокую противоопухолевую активность вместе с возможностью увеличения специфичности.

[00185] В настоящем документе описано создание и тестирование костимулирующих биспецифичных антител к TSAxCD28, нацеленных на рак яичников (MUC16xCD28, который связывает MUC16, большой интегральный мембранный гликопротеин, экспрессируемый на высоких уровнях при некоторых видах рака (H. Suh, K. Pillai, D. L. Morris, Mucins in pancreatic cancer: biological role, implications in carcinogenesis and applications in diagnosis and therapy. *Am J Cancer Res* 7, 1372-1383 (2017)), и который расщепляется с высвобождением биомаркера опухоли яичников CA-125 (I. Mylonas *et al.*, Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Anticancer Res* 23, 1075-1080 (2003))). Токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах, а также на яванских макаках демонстрируют, что эти биспецифики проявляют ограниченную активность и не обладают токсичностью при применении в качестве монотерапии. Однако эти новые костимулирующие биспецифики можно эффективно комбинировать с развивающимся классом биспецификов TSAxCD3 для усиления противоопухолевых ответов в моделях как ксеногенных опухолей, так и сингенных опухолей. В совокупности эти данные дают основания полагать, что комбинирование этого нового класса биспецификов на основе CD28 (TSAxCD28) с биспецификами на основе CD3 (TSAxCD3) может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной и синергической противоопухолевой активностью.

Пример 1. Конструирование антител к MUC16xCD28

Получение антител к CD28

[00186] Антитела к CD28 получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (*т. е.* генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) белком CD28 человека, слитым с Fc-частью IgG2a мыши, или клетками, экспрессирующими CD28, или ДНК, кодирующей CD28. Иммунный ответ антитела контролировали с помощью иммуноанализа, специфичного в отношении CD28. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками мышиной миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать линии клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, продуцирующих специфичные к CD28 антитела. С помощью этой методики получили несколько химерных антител к 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 клетками миеломы, как описано в заявке US 2007/0280945A1.

[00187] Некоторые биологические свойства иллюстративных антител к CD28, полученных в соответствии со способами, использованными в данном Примере, подробно описаны в Примерах, изложенных ниже.

Получение антител к MUC16

[00188] Антитела к MUC16 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши антигеном MUC16 человека или путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, антигеном MUC16 человека.

[00189] Генетически модифицированных мышей иммунизировали hMUC16.nub (усеченный формат, охватывающий последние пять доменов SEA муцина-16 (SEQ ID: 49)), или иммунизировали линией клеток, экспрессирующей hMUC16, такой как клетки OVCA-3. После иммунизации спленоциты собирали у каждой мыши и либо (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования клеток гибридомы, и подвергали скринингу для определения специфичности в отношении MUC16, либо (2) отсортировывали В-клетки (как описано в US 2007/0280945A1) с использованием фрагмента MUC16 человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки).

[00190] Сначала выделили химерные антитела к MUC16, имеющие вариабельную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. При необходимости константные области мыши заменяли желаемой константной областью человека, например, константной областью IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела к MUC16. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичностью в отношении мишени находятся в вариабельной области.

[00191] Определенные биологические свойства примерных антител к MUC16, полученных в соответствии со способами согласно данному Примеру, подробно описаны в Примерах, изложенных ниже.

Получение биспецифичных антител, связывающих CD28 и MUC16

[00192] Биспецифичные антитела, содержащие MUC16-специфичный связывающий домен и CD28-специфичный связывающий домен, конструировали с использованием стандартных методологий, в которых каждый из антигенсвязывающего домена против MUC16 и антигенсвязывающего домена против CD28 содержит различные отдельные HCVR, спаренные с общей LCVR. В некоторых случаях биспецифичные антитела конструировали с использованием тяжелой цепи из антитела к CD28, тяжелой цепи из антитела к MUC16 и общей легкой цепи (см. **Таблицу 5**).

[00193] Биспецифичные антитела, созданные в соответствии с настоящим Примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т. е. связывающие

плечи). Первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из антитела к CD28 («CD28-VH»), а второй антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, полученную из антитела к MUC16 («MUC16-VH»). Оба антитела к MUC16 и антитело к CD28 имеют общую легкую цепь. Спаривание CD28-VH/MUC16-VH создает антигенсвязывающие домены, которые специфично распознают CD28 на Т-клетках и MUC16 на опухолевых клетках.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты переменных областей тяжелой и легкой цепей

[00194] В Таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR отобранных антител к MUC16 согласно настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в Таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей антител к MUC 16

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
MAT 8799P2	2	4	6	8	10	12	14	16
MAT 8794P2	26	28	30	32	34	36	38	40

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты антител к MUC16

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
MAT 8799P2	1	3	5	7	9	11	13	15
MAT 8794P2	25	27	29	31	33	35	37	39

[00195] В Таблице 3 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR и LCVR) и CDR отобранных антител к CD28 согласно настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в Таблице 4.

Таблица 3: Идентификаторы аминокислотных последовательностей антител к CD28

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
MAT 14226P2	18	20	22	24	10	12	14	16
MAT 14216P2	42	44	46	48	34	36	38	40

Таблица 4: Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты антитела к CD28

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
MAT 14226P2	17	19	21	23	9	11	13	15
MAT 14216P2	41	43	45	47	33	35	37	39

[00196] Краткое описание составных частей различных сконструированных биспецифичных антител к MUC16хCD3 представлено в **Таблице 5**. В **Таблицах 6 и 7** перечислены идентификаторы последовательностей HCVR, LCVR, CDR, а также тяжелой и легкой цепей биспецифичных антител.

Таблица 5: Краткое описание составных частей биспецифичных антител к MUC16хCD28

Идентификатор биспецифичного антитела	Анти-MUC16	Анти-CD28	Общая вариабельная область легкой цепи
	Антигенсвязывающий домен	Антигенсвязывающий домен	
	<i>Вариабельная область тяжелой цепи</i>	<i>Вариабельная область тяжелой цепи</i>	
bs24963D	MAT 8799P2	MAT 14226P2	ULC3-20
bs32897D	MAT 8794P2	MAT 14216P2	ULC1-39

В **Таблице 6** показаны идентификаторы аминокислотных последовательностей биспецифичных антител к MUC16хCD28, приведенных в качестве примера в настоящем документе. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в **Таблице 7**.

Таблица 6: Аминокислотные последовательности биспецифичных антител к MUC16xCD28

Идентифи- катор биспецифично го антитела	Анти-CD28 Первый антигенсвязывающий домен (D1)				Анти-MUC16 Второй антигенсвязывающий домен (D2)				Общая вариабельная область легкой цепи			
	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCV R	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	18	20	22	24	2	4	6	8	10	12	14	16
bs32897D	42	44	46	48	26	28	30	32	34	36	38	40

Таблица 7: Последовательности нуклеиновой кислоты биспецифичных антител к MUC16xCD28

Идентифи- катор биспецифично го антитела	Анти-CD28 Первый антигенсвязывающий домен (D1)				Анти-MUC16 Второй антигенсвязывающий домен (D2)				Общая вариабельная область легкой цепи			
	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCV R	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bs24963D	17	19	21	23	1	3	5	7	9	11	13	15
bs32897D	41	43	45	47	25	27	29	31	33	35	37	39

Пример 3. CD28 представляет собой мощный костимулирующий рецептор

[00197] Чтобы определить, какие костимулирующие рецепторы эффективно обеспечивают костимулирующий сигнал, важный для активации Т-клеток, проводили слепой скрининг костимулирующих сигнальных путей с помощью принудительной экспрессии костимулирующих лигандов на панели сингенных опухолей (**Таблица 8** и **Фигура 1**), в котором вновь было установлено, что CD28, наряду с 4-1BB, является одним из наиболее мощных костимулирующих рецепторов. В **Таблице 8** обобщены данные по количеству мышей без опухолей в слепом скрининге. Анализы проводили на трех различных линиях опухолевых клеток, которые были генетически модифицированы для экспрессии семи различных костимулирующих лигандов. Число в каждой ячейке представляет собой количество мышей без опухолей в общей сложности из 5 мышей.

Таблица 8. Ингибирование роста опухоли в генетически модифицированных линиях клеток с введенной экспрессией костимулирующего лиганда

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

Пример 4. Значения аффинности связывания и кинетические константы биспецифичных антител к MUC16хCD28, полученные из анализа методом поверхностного плазмонного резонанса

[00198] Чтобы определить кинетику связывания примерных биспецифичных моноклональных антител к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению, определяли значения аффинности связывания и кинетические константы биспецифичных антител к MUC16хCD28 в отношении MUC16 и/или CD28 методом поверхностного плазмонного резонанса.

[00199] Равновесные константы диссоциации (значения K_D) для связывания hMUC16.mmh (SEQ ID NO: 51), hCD28.mmh (SEQ ID NO: 53) и mCD28.mmh (CD28.mmh мыши; SEQ ID NO: 54) с очищенным примерным биспецифичным моноклональным антителом к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению определяли с использованием биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T-200. Поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали путем связывания по аминокгруппе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека для захвата очищенных примерных биспецифичных антител к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению. Тестировали два примерных

биспецифичных антитела, bs24963D и REGN4615. REGN4615 представляет собой антитело/scFv, которое распознает MUC16 человека и CD28 мыши и иногда упоминается как антитело к MUC16xmsCD28. В плече к MUC16 в REGN4615 используются последовательности VH и VK-ULC 1-39, показанные выше в **Таблице 1** для MAT 8794P2. mCD28 (PV-1) описан в US2004/0116675 с легкой цепью из SEQ ID NO: 11 (см. также Фигуру 15A в US2004/0116675) и тяжелой цепью из SEQ ID NO: 13 (см. Фигуру 15), который был получен в формате scFv для экспериментов, описанных в настоящей заявке.

[00200] Данное исследование связывания методом SPR выполняли в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об./об. сурфактанта P20 при pH 7,4 (рабочий буфер HBS-ET). Для определения аффинности в сравнении с биспецифичными антителами к MUC16xCD28 и MUC16xmCD28 различные концентрации hMUC16 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (hMUC16.mmh), hCD28 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (hCD28.mmh) и mCD28 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (mCD28.mmh) готовили в рабочем буфере HBS-ET в диапазоне от 3,33 нМ до 90 нМ (для hMuc16) или от 22,2 нМ до 600 нМ (для hCD28 или mCD28) в виде последовательных 3-кратных разведений.

[00201] Поверхность высокочастотного сенсора для связывания аминокислотных групп MASS-2 сначала дериватизировали путем связывания по аминокислотным группам с моноклональным мышинным антителом к Fc человека для захвата приблизительно 500-900 RU биспецифичных моноклональных антител к MUC16xCD28 или MUC16xmCD28. 1 RU (единица ответа) представляет собой 1 пг белка на мм², как определено производителем. Различные концентрации hMUC16 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (hMUC16.mmh), hCD28 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (hCD28.mmh) и mCD28 с С-концевой меткой мус-мус-6xHis (mCD28.mmh) готовили в рабочем буфере HBS-ET в диапазоне от 3,33 нМ до 90 нМ (для hMuc16) или от 22,2 нМ до 600 нМ (для hCD28 или mCD28) в виде последовательных 3-кратных разведений и впрыскивали над поверхностями с биспецифичными моноклональными антителами к MUC16xCD28 и к MUC16xmCD28, захваченными с помощью антител к Fc человека, в течение 5 минут при скорости потока 50 мкл/минуту. Диссоциацию связанных реагентов hMUC16, hCD28 и mCD28 контролировали в течение 10 минут в рабочем буфере HBS-ET. Константы скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения для оценки Scrubber, версия 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периоды полужизни для диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

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

[00202] Параметры кинетики связывания примерных биспецифичных антител, связывающихся с очищенными рекомбинантными белками hMUC16, hCD28, mCD28 при 37°C, показаны ниже в **Таблицах 9-12**.

Таблица 9: Значения аффинности связывания согласно Biacore антител к MUC16xCD28 в отношении hMUC16

AbPID	Захват MAT (RU)	Связывание 90 нМ hMUC16.mmh (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K _D (M)	T _{1/2} (мин)
bs24963D (Эксперимент 1)	987,1 ± 9,9	365,0	4,41E+05	4,12E-04	9,33E-10	28,0
bs24963D (Эксперимент 2)	211,7 ± 1,2	120,0	2,38E+05	2,18E-04	9,12E-10	53,1

Таблица 10: Значения аффинности связывания согласно Biacore антител к MUC16xCD28 в отношении hCD28

AbPID	Захват MAT (RU)	Связывание 600 нМ hCD28.mmh (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K _D (M)	T _{1/2} (мин)
bs24963D	985,4 ± 2,7	88,9	3,27E+04	5,38E-03	1,65E-07	2,1

Таблица 11: Значения аффинности связывания согласно Biacore антител к MUC16xmsCD28 в отношении hMUC16

AbPID	Захват MAT (RU)	Связывание 90 нМ hMUC16.mmh (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K _D (M)	T _{1/2} (мин)
REGN4615	1041,0 ± 10,0	513,3	6,29E+05	4,72E-04	7,49E-10	24,5

Таблица 12: Значения аффинности связывания согласно Biacore антител к MUC16xmsCD28 в отношении mCD28

AbPID	Захват MAT (RU)	Связывание 90 нМ hMUC16.mmh (RU)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K _D (M)	T _{1/2} (мин)
REGN4615	1021,8 ± 4,0	25,8	2,07E+04	7,77E-05	3,76E-09	148,6

Пример 5. Связывание биспецифичных моноклональных антител к MUC16xCD28 с Т-клетками и клетками-мишенями

[00203] Для определения связывания примерных биспецифичных антител согласно настоящему изобретению на Т-клетках человека и яванской макаки и клетках-мишенях использовали анализ методом проточной цитометрии, чтобы определить связывание биспецифичных антител к MUC16xCD28 с клетками OVACR-3, PEO1, Raji в качестве отрицательного контроля и Т-клетками человека и яванской макаки с последующим детектированием с использованием меченого фикоэритрином (ФЭ) или меченого Alexa-647 антитела к IgG человека. В общих чертах, 1×10^5 клеток/лунку инкубировали в течение 30 минут при 4°C с последовательным разведением примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 или IgG4 для контроля изотипа, который связывает антиген человека без

перекрестной реактивности с CD28 человека или яванской макаки, в диапазоне от 133 нМ до 32,6 пМ для Т-клеток человека и яванской макаки и в диапазоне от 133 нМ до 81,4 пМ для MUC16-экспрессирующих клеток и клеток Raji в качестве отрицательного контроля. После инкубации клетки дважды промывали холодным ФСБ, содержащим 1% профильтрованной ФБС, затем к MUC16-экспрессирующим клеткам или Т-клеткам человека или яванской макаки добавляли ФЭ-конъюгированное или Alexa647-конъюгированное вторичное антитело к белку человека и инкубировали в течение еще 30 минут. К инкубируемым Т-клеткам человека и яванской макаки добавляли краситель для определения жизнеспособности клеток. В качестве контроля использовали лунки, не содержащие антитела или содержащие только вторичное антитело.

[00204] После инкубации с клетками, экспрессирующими MUC16, клетки промывали, повторно суспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% профильтрованной ФБС, и анализировали методом проточной цитометрии на BD FACS Canto II.

[00205] После инкубации с Т-клетками человека или яванской макаки клетки промывали, окрашивали смесью антител к CD2, к CD16, к CD4 и к CD8 в окрашивающем буфере Brilliant™ и продолжали инкубацию еще 20 минут при 4°C. После промывки клетки повторно суспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% профильтрованной ФБС, гейтировали по гейту живые/CD2⁺/CD4⁺/CD16⁻ или живые/CD2⁺/CD8⁺/CD16⁻ и анализировали методом проточной цитометрии на BD FACS LSR-Fortessa-X20.

[00206] Связывание примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 с поверхностью Т-клеток человека тестировали с помощью проточной цитометрии. bs24963D связывался с CD4⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 2,61×10⁻⁷ М. Он связывался с CD8⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 2,53×10⁻⁷ М. bs32897D слабо связывался с CD4⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 9,16×10⁻⁶ М. Он также слабо связывался с CD8⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 7,58×10⁻⁶ М. Результаты обобщены в **Таблице 13**.

Таблица 13: Связывание антител к MUC16xCD28 с Т-клетками человека

Антитело PiD	ЭК ₅₀ для CD4 ⁺ Т-клеток человека, FACS [М]	ЭК ₅₀ для CD8 ⁺ Т-клеток человека, FACS [М]
bs24963D	2,61E-07 М	2,53E-07 М
bs32897D	9,16E-06 М	7,58E-06 М
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

[00207] Связывание примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 с поверхностью Т-клеток яванской макаки тестировали с помощью проточной цитометрии. Примерный bs24963D связывался с CD4⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 2,03×10⁻⁷ М. Он связывался с CD8⁺ Т-клетками со значением ЭК₅₀ 1,22×10⁻⁷ М. Примерный bs32897D связывал клетки OVCAR-3 и PEO1 со значениями ЭК₅₀ 2,87×10⁻¹⁰ М и 5,96×10⁻¹⁰ М, соответственно. Примерный bs24963D не проявлял никакого связывания с MUC16-отрицательными контрольными клетками RAJI. Результаты обобщены в **Таблице 14**.

Таблица 14: Связывание антител к MUC16xCD28 с Т-клетками яванской макаки

Антитело PiD	ЭК ₅₀ для CD4 ⁺ Т-клеток яванской макаки, FACS [M]	ЭК ₅₀ для CD8 ⁺ Т-клеток яванской макаки, FACS [M]
bs24963D	2,03E-07 M	1,22E-07 M
bs32897D	5,70E-06 M	3,02E-06 M
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

[00208] Связывание примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 с поверхностью линий клеток, экспрессирующих MUC16, тестировали с помощью проточной цитометрии. bs24963D связывался с клетками OVCAR-3 и PEO1 со значениями ЭК₅₀ $6,09 \times 10^{-10}$ M и $4,67 \times 10^{-10}$ M, соответственно. bs32897D не проявлял никакого связывания с MUC16-отрицательными контрольными клетками RAJI. bs24963D связывал клетки OVCAR-3 и PEO1 со значениями ЭК₅₀ $2,87 \times 10^{-10}$ M и $5,96 \times 10^{-10}$ M, соответственно. bs24963D не проявлял никакого связывания с MUC16-отрицательными контрольными клетками RAJI. Антитело для контроля изотипа не проявляло никакого связывания с Т-клетками человека или яванской макаки, а также не связывалось с линиями клеток, экспрессирующими MUC16. Результаты обобщены в **Таблице 15**.

Таблица 15: Связывание антител к MUC16xCD28 с клетками, экспрессирующими MUC16

Антитело PiD	ЭК ₅₀ для клеток OVCAR-3 FACS [M]	ЭК ₅₀ для клеток PEO1 FACS [M]	ЭК ₅₀ для клеток Raji FACS [M]
bs24963D	6,09E-10 M	4,67E-10 M	Связывание отсутствует
bs32897D	2,87E-10 M	5,96E-10 M	Связывание отсутствует
Изотипический контроль	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

Пример 6. Первичный биотест на биспецифичные антитела к MUC16xCD28

[00209] Активация Т-клеток осуществляется путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR), которые распознают определенные пептиды, презентируемые белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (ГКГСИ или ГКГСII) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) (Goldrath *et al.*, Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire, Nature 402, 255-262 (1999)). Активированный TCR, в свою очередь, инициирует каскад сигнальных событий, которые можно отслеживать с помощью репортерных генов, управляемых различными факторами транскрипции, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор-усилитель каппа-легкой цепи (NFkB). Затем Т-клеточный ответ дополнительно оптимизируется путем задействования корецепторов, конститутивно или индуцируемо экспрессируемых на Т-клетках, таких как CD28, CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4), PD-1 (белок программируемой клеточной смерти 1), LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов) или другие молекулы (Sharpe *et al.*, The

B7-CD28 Superfamily, Nat. Rev. Immunol., 2(2): 116-26 (2002)). Костимулирующая молекула CD28 активируется ее эндогенными лигандами CD80 или CD86, экспрессируемыми на АПК. CD28 усиливает клеточные сигналы, такие как сигнальные пути, контролируемые фактором транскрипции NFκB, после активации TCR. Сопутствующий сигнал CD28 важен для эффективной активации Т-клеток, такой как дифференцировка, пролиферация, высвобождение цитокинов и уничтожение клеток Т-клетками (Smeets *et al.*, NFκB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-θ, PNAS, 97(7):3394-3399 (2012)).

[00210] Чтобы идентифицировать антитела, которые усиливают активность Т-клеток в присутствии как первичной стимуляции, так и экспрессии мишени MUC16, примерные биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению были охарактеризованы в клеточных анализах с использованием первичных Т-клеток человека. В анализах оценивается поведение биспецифичного антитела к MUC16/CD28 в условиях присутствия и отсутствия первичной стимуляции, а также в условиях присутствия и отсутствия экспрессии мишени.

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

[00211] Был разработан функциональный анализ первичных CD4⁺ Т-клеток/АПК для оценки эффекта активации CD28 на продукцию IL-2 при взаимодействии с биспецифичными антителами к MUC16хCD28.

а) Выделение первичных CD4⁺ Т-клеток человека:

[00212] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека выделяли из лейкоцитного концентрата, полученного от здорового донора. Выделение МКПК осуществляли с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ на 50 мл в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. В общих чертах, в пробирки SepMate на 50 мл наливали слой 15 мл FicollPaque PLUS с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1:2 с помощью ДФСБ. Последующие стадии проводили в соответствии с протоколом производителя SepMate. Затем из МКПК выделяли CD4⁺ Т-клетки с использованием наборов микрогранул к CD4 человека от Miltenyi Biotec, следуя инструкциям производителя. Выделенные CD4⁺ Т-клетки замораживали в ФБС, содержащей 10% ДМСО, в концентрации 5×10⁶ клеток на флакон.

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

[00213] В данном анализе первичные CD4⁺ Т-клетки человека активируют за счет перекрестного связывания молекул CD3, в комплексе с Т-клеточными рецепторами (TCR), с использованием биспецифичного антитела к αMuc16 х αCD3 (REGN4018), инкубированного с клетками-мишенями человека, OVCAR3 или PEO-1, экспрессирующими Muc16 на поверхности клетки. Связывание плеча против Muc16 REGN4018 с клетками-мишенями, экспрессирующими Muc16, запускает кластеризацию молекул CD3 и обеспечивает первый сигнал, необходимый для стимуляции Т-клеток в

отсутствие или в дополнение к аллогенному ответу. Однако в данном анализе, чтобы завершить активацию Т-клеток и повысить уровни высвобождения IL-2, необходима костимуляция, обеспечиваемая перекрестным связыванием молекул CD28. В данном случае биспецифичные антитела к CD28 взаимодействуют с CD28 на CD4⁺ Т-клетках и Muc16 на клетках OVCAR3 или PEO-1 и запускают кластеризацию - активацию костимулирующей молекулы, CD28. Комбинированное задействование TCR и CD28 приводит к усилению продукции IL-2, который высвобождается в культуральные среды. IL-2 детектируют и количественно определяют в клеточном супернатанте с использованием гомогенного, без промывок, набора AlphaLisa от PerkinElmer.

[00214] Ранее выделенные и замороженные CD4⁺ Т-клетки человека от Донора 104 размораживали в день проведения анализа в стимулирующих средах (среды для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% ФБС, HEPES, NaPyг, NEAA и 0,01 mM BME), содержащих 50 Ед./мл нуклеазы бензоназы. Клетки центрифугировали при 1200 об./мин в течение 10 минут, повторно суспендировали в стимулирующих средах и высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунку. Клетки OVCAR3 и PEO-1 обрабатывали митомицином С в средах для первичной стимуляции с использованием 25 мкг/мл митомицина С для клеток OVCAR3 и 10 мкг/мл для клеток PEO-1. После инкубации в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂, клетки-мишени 3 раза промывали буфером для промывки (ФСБ+2% ФБС) и добавляли в лунки, содержащие CD4⁺ Т-клетки в конечной концентрации 1×10^4 клеток OVCAR3 или $2,5 \times 10^4$ PEO-1 на лунку. Затем в лунки добавляли биспецифичные или контрольные антитела к CD28, последовательно разведенные 1:4, в диапазоне от 3 пМ до 200 нМ в присутствии постоянной концентрации 5 нМ REGN4018 (α Muc16 x α CD3) или антитела для отрицательного контроля (изотипический контроль hIgG4=H4sH). Конечная точка 10-точечного разведения не содержала антитело к CD28 и представляла собой фоновый сигнал. После инкубации планшетов в течение 72 часов при 37°C, 5% CO₂, их центрифугировали для осаждения клеток и собирали по 20 мкл супернатанта сред. Из этого объема 5 мкл тестировали в анализе IL-2 человека с помощью AlphaLISA в соответствии с протоколом производителя. Измерения были получены на многоканальном считывающем устройстве для планшетов Envision, и исходные значения RLU (относительные световые единицы) представили в виде графика. Все последовательные разведения были протестированы с двумя повторами.

[00215] Значения ЭК₅₀ антител определяли путем аппроксимации данных четырехпараметрическим логистическим уравнением на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Максимальную кратность индукции рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения IL-2 (фон)}}$$

[00216] Активация CD4⁺ Т-клеток (измеренная по высвобождению IL-2) усиливалась под действием hMUC16xhCD28 в присутствии первичной стимуляции (анти-MUC16xCD3) и MUC16, экспрессируемого на клетках-мишенях.

с) Результаты функционального анализа IL-2 с использованием первичных CD4⁺ Т-клеток человека:

[00217] Способность биспецифичных антител к MUC16хCD28 обеспечивать совместную стимуляцию посредством CD28 на выделенных CD4⁺ Т-клетках в отсутствие или в присутствии TCR-стимулирующего биспецифичного антитела (REGN4018=анти-Muc16 х анти-CD3) оценивали в функциональном анализе высвобождения IL-2 с использованием выделенных CD4⁺ Т-клеток человека, инкубированных с клетками-мишенями, эндогенно экспрессирующими Muc16 (клетки OVAR3 и PEO-1) на поверхности клетки.

[00218] Значения кратности индукции обобщены в **Таблицах 16** и **17** для CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с клетками OVCAR3 или PEO-1 в дополнение к постоянной концентрации 5 нМ изотипического контроля hIgG4 H4sH или антитела к Muc16хCD3 REGN4018.

[00219] При инкубации выделенных CD4⁺ Т-клеток с клетками-мишенями OVCAR3 или PEO-1 в отсутствие направленной стимуляции TCR за счет REGN4018 с использованием постоянного количества изотипического контроля H4sH детектированные количества IL-2 являются сходными между исходными антителами к CD28, биспецифичными антителами к MUC16хCD28 (bs32897D и bs24963D) и изотипическим антителом H4sH в качестве отрицательного контроля. (**Таблица 16**)

[00220] Напротив, в обработанных антителом к Muc16хCD3 (REGN4018) образцах детектируют повышенные уровни IL-2. В этих условиях, если CD4⁺ Т-клетки человека были совместно инкубированы с клетками OVCAR3 или PEO-1, оба биспецифичных антитела к CD28 повышают уровни IL-2 в большей степени, чем соответствующие им исходные антитела к CD28. Как и ожидалось, при использовании изотипического контроля не наблюдается минимальное высвобождение IL-2. (**Таблица 17**)

[00221] Если в качестве клеток-мишеней используют OVCAR3, сходное дозозависимое высвобождение IL-2 измеряют как для биспецифичных антител к CD28 (bs32897D: 5,63х и ЭК₅₀=606 пМ), так и для bs24963D: 5,32х и ЭК₅₀=401 пМ. В то время как для клеток PEO-1 можно было наблюдать различие в кратности индукции уровней IL-2 между обеими биспецифичными молекулами. В данном случае bs24963D (10,94х и ЭК₅₀=996 пМ) приводит к более высоким значениям IL-2, чем bs32897D (5,22х и ЭК₅₀ не могла быть определена, поскольку кривая зависимости ответа от дозы не достигла насыщения).

[00222] В отсутствие стимуляции TCR, либо посредством аллогенного ответа, либо посредством антитела к MUC16хCD3, не наблюдается измеримое высвобождение IL-2 с антителами к CD28 в лунках, содержащих постоянные количества изотипического контроля в присутствии клеток OVCAR3 или PEO-1 (**Таблица 16**). В **Таблице 16** обобщены значения ЭК₅₀ и кратная индукция высвобождения IL-2 из CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с OVCAR3 или PEO-1 и постоянной концентрацией 5 нМ изотипического контроля.

Таблица 16: Результаты по ЭК₅₀ и кратной индукции высвобождения IL-2 из первичных CD4⁺ Т-клеток человека в присутствии 5 нМ изотипического контроля IgG4 человека:

Антитела	OVCAR3		PEO-1	
	ЭК ₅₀ [М]	Кратность индукции	ЭК ₅₀ [М]	Кратность индукции
bs32897D	N/C	1,06	N/C	1,12
bs24963D	N/C	1,33	N/C	1,12
Исходный 1 hCD28 (для bs32897D)	N/C	1,10	N/C	1,30
Исходный 2 hCD28 (для bs24963D)	N/C	1,12	N/C	1,03
Изотипический контроль H4sH	N/C	1,12	N/C	1,48

Таблица 16. Табулированные значения ЭК₅₀ и максимальной кратности индукции высвобождения IL-2 по сравнению с фоновым сигналом от CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с OVCAR3 или PEO-1 и постоянной концентрацией 5 нМ изотипического контроля H4sH.

N/C=не рассчитано

[00223] Напротив, в образцах, обработанных антителом к MUC16хCD3, детектируют измеримые уровни IL-2 (RLU). В этих условиях, если CD4⁺ Т-клетки человека совместно инкубировали с клетками OVCAR3 или PEO-1, оба биспецифичных антитела к CD28 повышают уровни IL-2 в большей степени, чем их исходное антитело к CD28. Как и ожидалось, при использовании изотипического контроля не наблюдается высвобождение IL-2 (**Таблица 17**). В **Таблице 17** обобщены значения ЭК₅₀ и кратная индукция высвобождения IL-2 из CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с OVCAR3 или PEO-1 и постоянной концентрацией 5 нМ антитела к MUC16хCD3.

Таблица 17: Результаты по ЭК₅₀ и кратной индукции высвобождения IL-2 из первичных CD4⁺ Т-клеток человека в присутствии 5 нМ REGN4018 (антитело к Muc16хCD3):

Антитела	OVCAR3		PEO-1	
	ЭК ₅₀ [М]	Кратность индукции	ЭК ₅₀ [М]	Кратность индукции
bs32897D	6,07E-10	5,63	N/D	5,22
bs24963D	4,01E-10	5,32	9,96E-10	10,94
Исходный 1 hCD28 (для bs32897D)	N/D	1,58	N/D	1,42
Исходный 2 hCD28 (для bs24963D)	N/D	2,46	1,07E-10	2,05
Изотипический контроль H4sH	N/C	1,09	N/C	1,11

Таблица 17. Табулированные значения ЭК₅₀ и максимальная кратность индукции высвобождения IL-2 по сравнению с фоновым сигналом от CD4⁺ Т-клеток, совместно инкубированных с OVCAR3 или PEO-1 и постоянной концентрацией 5 нМ REGN4018 (антитело к Muc16хCD3). Сокращения: N/D=Не определено, поскольку кривая зависимости

ответа от дозы не достигла насыщения или имела куполообразную форму; N/C=не рассчитано

Пример 7. Биспецифичные антитела к MUC16хCD28 усиливают активацию Т-клеток и цитотоксичность в отношении клеток опухоли яичников в присутствии стимуляции TCR с помощью антитела к MUC16хCD3.

[00224] Чтобы исследовать, могут ли примерные биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению усиливать активацию Т-клеток, опосредуемую антителами к MUC16хCD3, и цитотоксичность в отношении клеток опухоли яичников, использовали FACS, чтобы исследовать жизнеспособность опухолевых клеток и фенотип Т-клеток после совместного культивирования *in vitro* с титрованием дозы MUC16хCD3 по отдельности или в комбинации с MUC16хCD28 (**Фигура 2А**. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека, содержащие Т-клетки, культивировали совместно с клетками рака яичников PEO-1, экспрессирующими эндогенные уровни MUC16 (Coscia, F. *et al*, Nat. Commun. (2016), August 26;7:12645).

[00225] Было проведено два исследования цитотоксичности на основе FACS. В первом исследовании проводили оценку цитотоксичности на основе FACS на MUC16⁺ клетках в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека и антитела к MUC16хCD3 в присутствии или в отсутствие стимуляции антителом к MUC16хCD28 (исследование цитотоксичности на основе FACS на MUC16⁺ клетках+МКПК человека +/- стимуляция MUC16хCD28 (условия матрицы MUC16хCD28 х Muc16хCD3)). Второе исследование в остальном идентично первому исследованию, за исключением того, что вместо МКПК человека используются МКПК яванских макак (исследование цитотоксичности на основе FACS на клетках MUC16+МКПК яванских макак +/- стимуляция MUC16хCD28 (условия матрицы MUC16хCD28 х MUC16хCD3)).

Методика эксперимента

[00226] Чтобы контролировать уничтожение MUC16⁺ клеток в присутствии комбинации антитела к MUC16хCD3 и примерного антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению, линии клеток, эндогенно экспрессирующие MUC16 (PEO1, MUC16⁺), метили 1 мкМ CellTracker™ Violet и высевали на ночь при 37°C. Отдельно МКПК человека (New York Blood Center (Нью-Йоркский центр крови)) или МКПК яванской макаки (Covance, Кранфорд, Нью-Джерси) высевали в среды RPMI с добавками в концентрации 1×10⁶ клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитами за счет обеднения адгезивными макрофагами, дендритными клетками и некоторыми моноцитами. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с обедненными адгезивными клетками наивными МКПК человека (соотношение эффектор/клетка-мишень 4:1) и последовательным разведением либо антитела к MUC16хCD3, либо ненацеленного биспецифичного антитела к CD3 (bs17664D), по отдельности или в комбинации с фиксированной концентрацией (2,5 мкг/мл) примерного биспецифичного антитела к MUC16хCD28, в течение 96 часов при 37°C. После инкубации

клетки удаляли из планшетов для культивирования клеток с использованием буфера для диссоциации трипсин-ЭДТА и анализировали с помощью проточной цитометрии (FACS).

[00227] Для FACS-анализа клетки окрашивали с помощью красителя cell tracker дальнего красного спектра для определения жизнеспособности (Invitrogen) и напрямую конъюгировали антитела к CD2, CD4, CD8 и CD25 (BD). Образцы анализировали с калибровочными микросферами для подсчета клеток. Для оценки специфичности уничтожения клетки-мишени гейтировали как популяции, положительные на Violet cell tracker. Процент живых клеток-мишеней рассчитывали следующим образом: процент жизнеспособных клеток = $(R1/R2) \times 100$, где R1=процент живых клеток-мишеней в присутствии антитела, а R2=процент живых клеток-мишеней в отсутствие тестируемого антитела. Активацию Т-клеток измеряли по проценту активированных (CD25⁺) Т-клеток из CD2⁺/CD4⁺ или CD2⁺/CD8⁺ Т-клеток. Положительную регуляцию маркера PD-1 оценивали путем инкубации клеток с напрямую конъюгированными антителами к CD2, к CD4, к CD8, к CD25 и к PD-1, а также путем регистрации процента PD-1⁺ Т-клеток от общего количества Т-клеток (CD2⁺). Количество Т-клеток измеряли путем расчета количества живых CD4⁺ или CD8⁺ клеток на калибровочную микросферу. Уровни цитокинов, накопленных в средах, анализировали с использованием набора микросфер для проточной цитометрии для анализа человеческих цитокинов Th1/Th2/Th17, BD cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit, в соответствии с протоколом производителя.

Результаты, краткие итоги и выводы:

[00228] Тестировали способность биспецифичного антитела к MUC16хCD3, в качестве единственного агента или в присутствии костимулирующего биспецифичного антитела к MUC16хCD28, индуцировать уничтожение наивными Т-клетками человека клеток-мишеней РЕО1, экспрессирующих MUC16 человека. Биспецифичное антитело к MUC16хCD3 активировало и направляло Т-клетки человека на истощение пула клеток РЕО1. Более того, MUC16хCD3 по отдельности индуцировало умеренное уничтожение Т-клетками раковых клеток РЕО-1, снижая их жизнеспособность до ~60% дозозависимым образом (**Фигура 2В** и **Таблица 18**). Уничтожение клеток-мишеней наблюдали в присутствии биспецифичного антитела к MUC16хCD3, и клетки РЕО1 были уничтожены дозозависимым образом с ЭК₅₀ на пикомолярном (пМ) уровне (**Фигура 2В**). Уничтожение клеток-мишеней не наблюдалось в отсутствие антитела к MUC16хCD3 (**Фигура 2В**). Наблюдаемый лизис клеток-мишеней был ассоциирован с положительной регуляцией CD25⁺ и PD-1⁺ клеток на CD2⁺ Т-клетках, снова со значениями ЭК₅₀ на пикомолярном уровне (**Таблица 18**).

[00229] Антитело к MUC16хCD3 индуцировало высвобождение цитокинов человека. Цитотоксическая активность, наблюдаемая при применении антитела к MUC16хCD3 в качестве единственного агента, усиливалась в присутствии примерных костимулирующих молекул против MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению, bs24963D и bs32897D.

[00230] Было обнаружено, что добавление примерного антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению увеличивало эффективность и интенсивность цитотоксичности, индуцированной MUC16хCD3, что приводило к дальнейшему снижению жизнеспособности раковых клеток РЕО-1 до менее чем 20% (более чем 3-кратное увеличение уничтожения Т-клетками) (**Фигура 2В**). Кроме того, примерное антитело к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению более чем в 10 раз повышало уровни высвобождения IFN γ , индуцированного MUC16хCD3 (**Фигура 2С**). Комбинация MUC16хCD28 и MUC16хCD3 увеличивала количество CD4 и CD8 Т-клеток и повышала уровень экспрессии маркера активации CD25 (**Фигуры 2D-E**). Примечательно, что MUC16хCD28 в комбинации с ненацеливающим биспецификом CD3 не индуцировало цитотоксичность или активацию Т-клеток (**Фигура 2В**).

[00231] Подытоживая, костимуляция увеличивала активацию Т-клеток, положительную регуляцию PD-1 и высвобождение цитокинов по сравнению с наблюдениями, сделанными при применении биспецифичного антитела к MUC16хCD3 в качестве единственного агента. В **Таблицах 18 и 19** и на **Фигурах 2А-2Е** обобщены экспериментальные результаты с использованием МКПК человека.

Таблица 18: Влияние антитела к MUC16хCD28 на цитотоксичность антитела к MUC16хCD3 в отношении клеток РЕО1 в присутствии МКПК человека

PiD	ЭК ₅₀ для уничтожения РЕО1 [M]	РЕО1 мин.% жизнеспособности	ЭК ₅₀ для активации Т-клеток [M] (CD8 ⁺ /CD25 ⁺)	Положительная регуляция PD-1 (CD4 ⁺ /PD1 ⁺) макс.%
MUC16хCD3	1,27E-10	57%	2,94E-10	27,2%
MUC16хCD3+bs2 4963D	От 1,07E-10 до 5,31E-11	9,8%	От 1,86E-10 до 3,94E-11	65,7%
MUC16хCD3+bs3 2897D	От 2,6E-10 до 7,40E-11	17,7%	От 4,82E-10 до 4,42E-11	58,4%

[00232] Также тестировали способность биспецифичного антитела к MUC16хCD3, в качестве единственного агента или в присутствии костимулирующего биспецифичного антитела к MUC16хCD28, индуцировать уничтожение наивными Т-клетками яванской макаки клеток-мишеней, экспрессирующих MUC16 человека. Аналогичные анализы выполняли с использованием МКПК яванской макаки и получили сходные результаты (**Фигуры 2F-H**). На **Фигуре 2I** показано, что примерное биспецифичное антитело к MUC16хCD28 связывается с клеточными мишенями согласно результатам измерения с помощью проточной цитометрии. Эти результаты продемонстрировали, что биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению могут эффективно усиливать опосредуемую MUC16хCD3 активацию Т-клеток не только посредством пролиферации и высвобождения цитокинов, но также за счет цитотоксичности. При выбранном титре антитела биспецифичное антитело к MUC16хCD3 активировало Т-клетки человека, но не направляло Т-клетки на истощение пула клеток

РЕО1 (Таблица 19). Костимуляция примерным антителом к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению привела к повышению активации Т-клеток, усилению цитотоксической активности и положительной регуляции маркера PD-1 на Т-клетках (Таблица 19).

Таблица 19: Влияние антитела к MUC16хCD28 на цитотоксичность антитела к MUC16хCD3 в отношении клеток РЕО1 в присутствии МКПК яванской макаки

PiD	ЭК ₅₀ для уничтожения РЕО1 [М]	РЕО1 мин.% жизнеспособности	ЭК ₅₀ для активации Т-клеток [М] (CD8 ⁺ /CD25 ⁺)	Положительная регуляция PD-1 макс.% (CD4 ⁺ /PD1 ⁺)
MUC16хCD3	2,09E-10	69%	1,59E-10	24,4%
MUC16хCD3+bs24963D	От 1,29E-10 до 3,34E-11	18,1%	От 1,04E-10 до 9,07E-11	44,3%
MUC16хCD3+bs32897D	От 3,92E-10 до 1,09E-10	29,7%	От 2,81E-10 до 7,67E-11	40,3%

Пример 8. Исследование антитела к MUC16хCD28 *in vivo*

[00233] Комбинирование нацеленных на опухолевый антиген биспецифичных антител к CD3хMUC16 и к CD28хMUC16 усиливало устранение опухоли в модели на мышах. Как подробно показано ниже, рост опухоли OVCAR-3 значительно ингибировался у мышей, которым вводили антитело к CD3хMUC16 и примерное антитело к CD28хMUC16 согласно настоящему изобретению, по сравнению с мышами, которым вводили только антитело к CD3хMUC16 или изотипический контроль.

[00234] Чтобы исследовать, может ли MUC16хCD28 усиливать противоопухолевую эффективность MUC16хCD3 *in vivo*, использовали две различные модели опухолей, модель ксеногенной асцитной опухоли и модель сингенной опухоли на мышах, как подробно описано ниже.

Модель ксеногенной асцитной опухоли

[00235] В модели ксеногенной асцитной опухоли клетки серозной карциномы яичников высокой степени злокачественности OVCAR-3 человеческого происхождения, экспрессирующие высокие эндогенные уровни MUC16, имплантируют внутрибрюшинно мышам NSG, которым предварительно привиты МКПК человека (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019:Vol 11, Issue 497, eaau7534). Клетки OVCAR-3 были модифицированы с использованием репортера люциферазы для отслеживания динамики роста опухоли с использованием биолуминесценции *in vivo* (BLI).

Методика эксперимента

[00236] Эксперименты выполняли, как описано в (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. *Science Translational Medicine* 19 Jun 2019:Vol 11, Issue 497, eaau7534). В общих чертах, мышам вводили путем в/б инъекции 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина (Perkin Elmer), суспендированного в ФСБ. Через десять минут визуализацию мышей методом BLI выполняли под изофлурановой анестезией с использованием системы Xenogen IVIS (Perkin Elmer). Получение изображения осуществляли с использованием поля зрения на D, высоты субъекта 1,5 см и среднего уровня биннинга (binning) для времени экспозиции 0,5 мин. Сигналы BLI получали с использованием программного обеспечения Living Image (Xenogen; Аламеда, Калифорния, США). Области, представляющие интерес, были нарисованы вокруг каждой опухолевой массы, и значения интенсивности потока фотонов регистрировали как ф/с/см²/ср (количество фотонов в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан). Мышей, которые не получали клетки OVCAR-3/Luc, использовали для получения исходного показателя для определения активности методом BLI. Мышей без опухолей для получения исходного показателя (N=3) визуализировали каждый день, и нижний предел детектирования (LOD) рассчитывали как средний показатель BLI для всех визуализированных мышей без опухолей.

[00237] Мышам NSG (нокаут по гамма-цепи NOD SCID) в возрасте восьми-десяти (8-10) недель (Jackson Laboratory, Мэриленд, США) вводили путем инъекции 5×10⁶ МКПК человека (ReachBio, Сиэтл, Вашингтон, США). Через десять-четырнадцать (10-14) дней у мышей брали кровь через хвостовую вену, чтобы определить приживление Т-клеток человека. В течение двух недель после переноса МКПК 2×10⁶ клеток асцита из линии клеток OVCAR-3/Luc, предварительно пассированных *in vivo*, вводили внутривенно (в/в) в течение двух недель (День 0). У мышей проверяли приживление Т-клеток с помощью проточной цитометрии, а затем распределяли по группам с использованием BLI, чтобы гарантировать аналогичную опухолевую нагрузку. Через четыре дня после имплантации опухоли мышей разделили на группы по 5 животных в каждой с медианой BLI 1,49×10⁵ или 3,03×10⁵ ф/с/см²/ср для двух исследований. Мышей лечили указанными биспецифичными или контрольными антителами на день 5 и 8. Мышам дважды вводили путем внутривенной (в/в) инъекции антитело к MUC16хCD3 или CD3-связывающий контроль с примерным антителом к MUC16хCD28 (bs24963D) согласно настоящему изобретению или без него. Визуализацию проводили несколько раз на протяжении всего исследования, чтобы отслеживать рост опухоли.

[00238] Уровни цитокинов в сыворотке крови также были получены в указанный момент времени. В указанные моменты времени кровь собирали посредством пункции подчелюстной вены в пробирки для сыворотки microtainer (BD 365967). Уровни цитокинов анализировали с использованием набора V-plex Human ProInflammatory-10 Plex в

соответствии с инструкциями производителя (Meso Scale Diagnostics, г. Роквилл, штат Массачусетс).

[00239] Все процедуры проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных NIH. Протокол был одобрен Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Regeneron Pharmaceuticals. Всего было завершено 2 исследования с 5 мышами на группу.

Результаты, краткие итоги и выводы

[00240] Для исследований ксеногенных опухолей использовали две модели. В случае первой ксеногенной модели мышам NSG вводили путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции клетки OVCAR-3/Luc, предварительно пассированные *in vivo* (День 0), через тринадцать дней после приживления МКПК человека. Мыши получали в/в инъекции в Дни 5 и 8. Мыши получали либо 12,5 мкг антитела к MUC16xCD3, либо 12,5 мкг CD3-связывающего контроля (изотип hIgG4^{P-PVA}). Некоторым мышам также вводили примерное антитело к MUC16xCD28 согласно настоящему изобретению (bs24963D) в дозе 100 мкг. Опухолевую нагрузку оценивали с помощью BLI в Дни 4, 8, 12, 15, 20 и 25 после имплантации опухоли. При введении примерного bs24963D без антитела к MUC16xCD3 не наблюдались уменьшенные опухоли, видимые с помощью BLI. Напротив, в то время как лечение с использованием 12,5 мкг антитела к MUC16xCD3 значительно уменьшало опухоли, видимые с помощью BLI, примерное антитело к MUC16xCD28 согласно настоящему изобретению значительно усиливало эффективность по сравнению с антителом к MUC16xCD3 по отдельности (Таблицы 20-22).

[00241] В Таблице 20 обобщены данные по уровню биолуминесценции на День 4 после имплантации опухоли в первой ксеногенной модели OVCAR-3/Luc.

Таблица 20: Модель OVCAR-3/Luc. Уровень биолуминесценции на День 4 после имплантации опухоли

Антитело (мкг)	Средняя яркость [ф/с/см ² /ср] через 4 дня после имплантации (медиана ± СОС)
CD3-связывающий контроль (12,5)	$1,51 \times 10^5 \pm 2,81 \times 10^4$
Антитело к MUC16xCD3 (12,5)	$1,5 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^4$
CD3-связывающий контроль (12,5) + антитело к MUC16xCD28 (100)	$1,53 \times 10^5 \pm 2,01 \times 10^4$
Антитело к MUC16xCD3 (12,5) + антитело к MUC16xCD28 (100)	$1,27 \times 10^5 \pm 2,29 \times 10^4$

[00242] В Таблице 21 обобщены данные по уровню биолуминесценции на день 25 после имплантации опухоли в первой ксеногенной модели OVCAR-3/Luc.

Таблица 21: Модель OVCAR-3/Luc. Уровень биолуминесценции на День 25 после имплантации опухоли

Антитело (мкг)	Средняя яркость [ф/с/см ² /ср] через 25 дней после имплантации (медиана ± СОС)
CD3-связывающий контроль (12,5)	$7,71 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^6$

Антитело к MUC16хCD3 (12,5)	$7,44 \times 10^3 \pm 3,11 \times 10^3$
CD3-связывающий контроль (12,5) + антитело к MUC16хCD28 (100)	$6,04 \times 10^6 \pm 8,32 \times 10^5$
Антитело к MUC16хCD3 (12,5) + антитело к MUC16хCD28 (100)	$1,31 \times 10^3 \pm 3,05 \times 10^1$

[00243] В Таблице 22 обобщены данные по кратному изменению BLI между Днем 4 и Днем 25 после имплантации опухоли в первой ксеногенной модели OVCAR-3/Luc.

Таблица 22: Модель OVCAR-3/Luc. Кратное изменение BLI между Днем 4 и Днем 25 после имплантации опухоли

Антитело (мкг)	Кратное изменение средней яркости [ф/с/см ² /ср] с Дня 4 по День 25 после имплантации (среднее $\pm$ СО)
CD3-связывающий контроль (12,5)	$50,72 \pm 29,67$
Антитело к MUC16хCD3 (12,5)	$-0,94 \pm 0,05$
CD3-связывающий контроль (12,5) + антитело к MUC16хCD28 (100)	$35,38 \pm 8,18$
Антитело к MUC16хCD3 (12,5) + антитело к MUC16хCD28 (100)	$-0,99 \pm 0,00$

[00243] В случае второй ксеногенной модели мышам NSG вводили путем инъекции клетки OVCAR-3/Luc, предварительно пассированные *in vivo* (День 0), через десять дней после приживления МКПК человека. Мышам вводили в/в 0,5 мг/кг антитела к MUC16хCD3 или вводили 0,5 мг/кг CD3-связывающего контроля в Дни 5 и 8. Опухолевую нагрузку оценивали с помощью BLI в Дни 4, 8, 11, 14, 21, 28 и 34 после имплантации опухоли. Некоторым мышам также вводили примерное антитело к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению (bs24963D) в дозе 0,2 мг/кг, 1 мг/кг или 5 мг/кг. Примерный bs24963D не уменьшал опухолевую нагрузку при введении без антитела к MUC16хCD3. Напротив, в то время как лечение с использованием 0,5 мг/кг антитела к MUC16хCD3 значительно уменьшало опухоли, видимые с помощью BLI, примерное антитело к MUC16хCD28 усиливало эффективность по сравнению с антителом к MUC16хCD3 по отдельности (Таблицы 23-25 и Фигура 4А).

[00244] В Таблице 23 обобщены данные по уровню биолюминесценции на День 4 после имплантации опухоли во второй ксеногенной модели OVCAR-3/Luc.

Таблица 23: Модель OVCAR-3/Luc. Уровень биолюминесценции на День 4 после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Средняя яркость [ф/с/см ² /ср] через 4 дня после имплантации (медиана $\pm$ СОС)
CD3-связывающий контроль (0,5)	$3,65 \times 10^5 \pm 5,50 \times 10^4$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5)	$3,76 \times 10^5 \pm 2,40 \times 10^4$
CD3-связывающий контроль (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$2,71 \times 10^5 \pm 2,65 \times 10^4$

Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$3,18 \times 10^5 \pm 4,45 \times 10^4$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (1)	$3,07 \times 10^5 \pm 4,37 \times 10^4$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (0,2)	$2,86 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^4$

[00245] В **Таблице 24** обобщены данные по уровню биолюминесценции на День 25 после имплантации опухоли во второй ксеногенной модели OVCAR-3/Luc

Таблица 24: Модель OVCAR-3/Luc. Уровень биолюминесценции на День 34 после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Средняя яркость [ф/с/см ² /ср] через 34 дня после имплантации (медиана $\pm$ СОС)
CD3-связывающий контроль (0,5)	$1,79 \times 10^7 \pm 2,17 \times 10^6$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5)	$9,60 \times 10^4 \pm 4,55 \times 10^4$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$2,34 \times 10^7 \pm 1,12 \times 10^6$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$2,45 \times 10^3 \pm 4,49 \times 10^3$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (1)	$1,62 \times 10^3 \pm 2,32 \times 10^3$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (0,2)	$1,29 \times 10^3 \pm 4,77 \times 10^1$

[00246] В **Таблице 25** обобщены данные по кратному изменению BLI между Днем 4 и Днем 34 после имплантации опухоли во второй ксеногенной модели OVCAR-3/Luc.

Таблица 25: Модель OVCAR-3/Luc. Кратное изменение BLI между Днем 4 и Днем 34 после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Кратное изменение средней яркости [ф/с/см ² /ср] с Дня 4 по День 34 после имплантации (среднее $\pm$ СО)
CD3-связывающий контроль (0,5)	$51,35 \pm 27,59$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5)	$-0,64 \pm 0,31$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$64,62 \pm 36,38$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (5)	$-0,97 \pm 0,04$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (1)	$-0,99 \pm 0,02$
Антитело к MUC16хCD3 (0,5) + антитело к MUC16хCD28 (0,2)	$-1,00 \pm 0,00$

[00247] Другие результаты второй ксеногенной модели с использованием других дозировок показаны на **Фигуре 3А**. У мышей, получавших MUC16хCD3 в дозе 2,5 мкг на День 5 и 8 после имплантации опухоли, значительно снизилась опухолевая нагрузка по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее контрольное антитело (EGFRvIIIхCD3), однако опухолевые клетки OVCAR-3/Luc исчезли не полностью (**Фигура 3А**). Комбинирование MUC16хCD3 в дозе 2,5 мкг с MUC16хCD28 в дозе 100 мкг

дополнительно ингибировало рост опухоли с более долговременным отторжением опухолевых клеток с течением времени (**Фигура 3А**). В этом же эксперименте также были получены уровни цитокинов в сыворотке. На **Фигуре 3В** показаны уровни цитокинов (пг/мл) у мышей, получавших различные антитела и/или комбинации антител. На **Фигуре 3С** показана опухолевая нагрузка и корреляция с уровнями СА-125 в сыворотке на день 26.

[00248] Чтобы протестировать способность CD28- и CD3-биспецификов стимулировать уничтожение опухоли *in vivo*, использовали хорошо известную внутрибрюшинную модель ксеногенной опухоли яичников OVCAR-3. В этой модели опухолевые клетки вводят мышам с иммунодефицитом, которых восстанавливают с использованием МКПК человека. Как и другие линии клеток рака яичников, клетки OVCAR-3 экспрессируют MUC16. Перед имплантацией клетки OVCAR-3 модифицировали репортером люциферазой, чтобы обеспечить отслеживание динамики роста опухоли *in vivo* с использованием биOLUMиНесценции (BLI). Имплантированные опухоли OVCAR-3 неуклонно росли у мышей, получавших биспецифик EGFRvIIIхCD3, контрольный CD3-биспецифик, который не связывался с этими клетками, и у мышей, получавших только биспецифик MUC16хCD28 (**Фигура 3А**). Несмотря на то, что биспецифик MUC16хCD3 по отдельности продемонстрировал значительную противоопухолевую активность, он не полностью устранял опухоли OVCAR-3 (**Фигура 3А**), в то время как добавление биспецифика MUC16хCD28 к биспецифику MUC16хCD3 усиливало противоопухолевый эффект *in vivo* (**Фигура 3А**) по сравнению с MUC16хCD3 по отдельности. В соответствии с повышенной противоопухолевой активностью комбинация обоих биспецификов также повышала секрецию циркулирующих цитокинов (**Фигура 3В**).

[00249] Биспецифики MUC16 связываются с оставшимся «кусочком» (nub) MUC16 (остаток на клеточной поверхности после отщепления и высвобождения СА-125) на поверхности клеток рака яичников после того, как протеолитическое расщепление высвободило прогностический биомаркер рака яичников СА-125 (I. Mylonas *et al.*, Immunohistochemical expression of the tumour marker CA-125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Anticancer Res* **23**, 1075-1080 (2003)), но не связывают растворимый СА-125 (**Фигуры 9А и 9В**). Чтобы определить, нарушает ли биспецифик MUC16хCD28 возможность использовать СА-125 в качестве биомаркера опухолевой нагрузки яичников, измеряли уровни СА-125 у мышей. Уровни СА-125 коррелировали с опухолевой нагрузкой независимо от лечения. Самые низкие уровни СА-125 наблюдали у мышей, получавших комбинацию биспецификов (**Фигура 3С**), как ранее было продемонстрировано для биспецифика MUC16хCD3.

Сингенная модель на мышах

Методика эксперимента

[00250] Сингенные исследования проводили на мышах, генетически модифицированных с использованием технологии VelociGene® для экспрессии CD3 человека и части MUC16 человека для исследований MC38, как описано ранее (Valenzuela *et al.*, (2003) *Nat. Biotechnol.* June; 21(6):652-9), (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K,

Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. *Science Translational Medicine* 19 Jun 2019; Vol 11, Issue 497, eaau7534). Мышей, экспрессирующих CD3 человека, CD28 человека и часть MUC16 человека, использовали для исследований ID8-VEGF. Для гуманизации CD3 модифицировали нацеливающий вектор, который заменил внеклеточные части генов CD3 мыши ($\gamma\delta\epsilon$) соответствующей областью генов человека. Для гуманизации CD28 модифицировали нацеливающий вектор, который заменил внеклеточные части гена CD28 мыши соответствующей областью гена человека. Для MUC16 повторы SEA 13-17 мыши заменяли повторами SEA 12-16 человека. Для каждой гуманизированной мыши правильное нацеливание на гены в клонах эмбриональных стволовых (ES) клеток F1H4 (гибрид C57BL/6 $\times$ 129) выявляли с помощью анализа потери аллелей, как описано ранее (Poueymirou et al (2007), *Nat. Biotechnol.* January; 25(1):91-9). Нацеленные ES клетки инъецировали эмбрионам Swiss Webster на 8-клеточной стадии для получения полностью гетерозиготных мышей поколения F0 для скрещивания с мышами C57BL/6N (Taconic, Ренселер, Нью-Йорк) до гомозиготности. Затем мышей, экспрессирующих внеклеточную часть CD3 человека ($\gamma\delta\epsilon$), внеклеточную часть CD28 человека и часть MUC16 человека, скрещивали до гомозиготности (упоминаются как мыши, гуманизированные по hCD3/hMuc16 или hCD3/hCD28/hMUC16).

[00251] Чтобы исследовать эффективность в иммунокомпетентной модели, создавали «нокин» (knock-in) мыш. Т-клетки этой мыши экспрессируют CD3 человека и вместо MUC16 мыши экспрессируется химерная молекула, которая содержит часть MUC16 человека, с которой связывается примерное биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению. Соответственно, в данном исследовании можно использовать молекулу антитела к MUC16хCD3. Чтобы изучить, может ли добавление нацеливающей биспецифичной молекулы к CD28 повысить эффективность у этих мышей, также создавали суррогатное биспецифичное антитело. Суррогатное антитело распознавало MUC16 человека, но не CD28 мыши, чтобы исследовать эффекты костимуляции CD28, и иногда упоминается как антитело к MUC16хmCD28. Для модели сингенной опухоли использовали линию клеток MC38, модифицированную для экспрессии части MUC16 человека. Мышам подкожно (п/к) имплантировали клетки MC38/huMUC16 и вводили 0,01 мг/кг антитела к MUC16хCD3 в день имплантации два раза в неделю до дня 21. Лечение 0,01 мг/кг антитела к MUC16хCD3 приводило к значительной противоопухолевой эффективности, а добавление MUC16хmCD28 усиливало этот эффект. (См. **Фигуры 6А, 6В, 6С и 6D**). *Имплантация и измерение сингенных опухолей*

[00252] Мышам, экспрессирующим CD3 человека и химеру MUC16 человека-мыши в соответствующих локусах мыши, подкожно имплантировали 1×10^6 клеток MC38/huMUC16. Мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили антитело к MUC16хCD3 или изотипический контроль с суррогатным биспецифичным антителом, распознающим

MUC16 человека и CD28 мыши, или без него, два раза в неделю на протяжении всего исследования до дня 21. Лечение началось в день имплантации. Рост опухоли измеряли с помощью штангенциркулей дважды в неделю. Мышей умерщвляли через 50 дней после имплантации опухоли.

Расчет роста и ингибирования сингенной опухоли

[00253] Чтобы определить объем опухоли с помощью наружного штангенциркуля, определяли наибольший продольный диаметр (длина) и наибольший поперечный диаметр (ширина). Объем опухоли, на основании измерений штангенциркулем, рассчитывали по формуле: Объем = (длина × ширина²)/2. Динамику роста опухоли контролировали, используя штангенциркуль для измерения диаметра X и Y. Мышей умерщвляли, когда опухоли вырастали до размера, превышающего 2000 мм³. Статистическую значимость определяли с использованием непарного непараметрического t-критерия Манна-Уитни.

Результаты

[00254] Размеры опухолей в модели MC38/huMUC16 при различных обработках обобщены в **Таблице 26**.

Таблица 26: Модель MC38/huMUC16. Размер опухоли (мм³) на День 21

Антитело (мкг)	Размер опухоли (мм³) (среднее ± СОС)
Изотипический контроль (0,5)	1191 ± 424
Антитело к MUC16xCD3 (0,01)	639,5 ± 186,8
Антитело к MUC16xmCD28 (0,5)	648,5 ± 129,7
Антитело к MUC16xCD3 (0,01) + антитело к MUC16xmCD28 (0,5)	167,3 ± 71,9

Тестировали способность примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 согласно настоящему изобретению усиливать противоопухолевую эффективность MUC16xCD3 в сингенной модели на мышах с полностью интактной иммунной системой. Мышей генетически модифицировали для экспрессии CD3 человека и MUC16 человека вместо генов мыши с использованием технологии VelociGene (Crawford A, Haber L, Kelly MP, Vazzana K, Canova L, Ram P, Pawashe A, Finney J, Jalal S, Chiu D, Colleton CA, Garnova E, Makonnen S, Hickey C, Krueger P, Delfino F, Potocky T, Kuhnert J, Godin S, Retter MW, Duramad P, MacDonald D, Olson WC, Fairhurst J, Huang T, Martin J, Lin JC, Smith E, Thurston G, Kirshner JR. A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer. Science Translational Medicine 19 Jun 2019: Vol 11, Issue 497, eaau7534). Линию клеток карциномы ободочной кишки MC38 модифицировали для экспрессии MUC16 человека (pLVX.EF1a.MUC16, MC38/hMUC16) и имплантировали подкожно. Мышам вводили путем внутрибрюшинной инъекции 2 раза в неделю, начиная со дня имплантации (день 0), изотипический контроль (Iso Ctrl), 0,01 мг/кг MUC16xCD3, 0,5 мг/кг MUC16xmCD28 или комбинацию. Контролировали динамику роста опухоли (**Фигура 6А**). Монотерапия MUC16xCD3 или MUC16xCD28 значительно ингибировала рост опухоли. Комбинированное лечение MUC16xCD3 и MUC16xCD28 дополнительно значительно ингибировало рост опухоли (**Таблица 26**). В этом же эксперименте также были получены

уровни цитокинов в сыворотке. На **Фигуре 6В** показаны уровни цитокинов у мышей, получавших различные антитела и/или комбинации антител.

[00255] Соответствующим гуманизированным мышам MC38/hMUC16 имплантировали опухолевые клетки и обрабатывали с использованием контроля, отдельных CD3- или CD28-биспецификов или их комбинаций (**Фигуры 6А, 6С и 6D**). В модели опухоли MUC16 комбинация CD3- и CD28-биспецификов обеспечивала наилучшие противоопухолевые ответы (**Фигура 6А**), что также было отмечено в анализах продукции цитокинов (**Фигура 6С и 6D**).

[00256] Чтобы изучить, может ли добавление нацеливания соединения-кандидата MUC16хCD28 повысить эффективность в сингенной модели, использовали мышей, экспрессирующих CD3 человека вместо MUC16 мыши, CD28 человека вместо CD28 мыши и химерную молекулу, которая содержит часть MUC16 человека, с которой связываются примерные биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению. Линию клеток ID8-VEGF модифицировали для экспрессии MUC16 человека (ID8-VEGF/hMUC16) и имплантировали внутрибрюшинно. Мышам вводили 1 мг/кг EGFRvIIIхCD3 или MUC16хCD3 по отдельности или в комбинации с MUC16хCD28 в дни 3, 6 и 10 после имплантации опухоли. Рост опухоли контролировали на основании прибавки массы тела (**Фигура 5**). Антитело к MUC16хCD3 ингибировало рост опухоли, и комбинация с MUC16хCD28 дополнительно задерживала рост опухоли.

[00257] Примечательно, что в отличие от предыдущих анализов *in vitro* и *in vivo*, в которых CD28-биспецифики имели очень ограниченную активность при применении в качестве единственного агента (см. выше), в этой сингенной модели MC38/hMUC16 CD28-биспецифики имели более значительную активность при применении в качестве единственных агентов. Это свидетельствует о том, что в этих моделях MC38 «сигнал 1» уже был активирован в некоторой степени. В соответствии с этими данными ранее было показано, что опухолевые клетки MC38 экспрессируют высокие уровни реактивированных эндогенных ретровирусных белков, таких как p15E, и что мыши C57BL6 могут генерировать эндогенные Т-клетки, которые распознают этот неоэпитоп и отвечают на него (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior *in vitro* and *in vivo* antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). Действительно, было подтверждено, что в моделях MC38 согласно настоящему изобретению легко могут быть детектированы внутриопухолевые Т-клетки, отвечающие на этот неоантиген p15E (данные не показаны). Таким образом, в этой модели сингенной опухоли MUC16 CD28-биспецифики могут стимулировать эндогенные TCR/CD3-зависимые Т-клеточные ответы, которые затем могут быть дополнительно усилены путем обеспечения дополнительной активации посредством «сигнала 1» за счет CD3-биспецифика.

[00258] Давно известно, что активация Т-клеток за счет комплекса TCR («сигнал 1») может быть заметно усилена костимулирующими сигналами, такими как сигналы, которые опосредуются при взаимодействии рецептора CD28 на Т-клетках с его лигандами (CD80/B7.1 и CD86/B7.2) на клетках-мишенях («сигнал 2») (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). В соответствии с нашими данными способность костимуляции CD28 усиливать противоопухолевую активность Т-клеток впервые была продемонстрирована в исследованиях, в которых лиганды B7 были сверхэкспрессированы на опухолевых клетках (R. H. Schwartz, Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068 (1992); L. Chen *et al.*, Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* **71**, 1093-1102 (1992)), которые показали улучшенное отторжение Т-клетками таких B7-экспрессирующих опухолей. Этот потенциал вдохновил попытки оценить активирующие CD28 антитела в испытаниях на людях. К сожалению, испытание такого антитела (TGN1412) в 2006 году привело к угрожающим жизни осложнениям у всех шести добровольцев (G. Suntharalingam *et al.*, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)) из-за полиорганной недостаточности в результате синдрома массивного высвобождения цитокинов (CRS). Эта катастрофа привела к прекращению любых дальнейших тестов активирующих CD28 антител на людях.

[00259] CD28-биспецифичные антитела, которые не будут непосредственно активировать CD28, за исключением случаев, когда он кластеризован на поверхности опухолевых клеток, обеспечивали возможность усиления костимуляции только в очаге опухоли, без системной токсичности обычных CD28-активирующих антител. Первоначальные варианты таких CD28-биспецификов были предложены и оценены в 1990-х годах (C. Renner *et al.*, Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells. *Science* **264**, 833-835 (1994); G. Jung *et al.*, Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy. *Int J Cancer* **91**, 225-230 (2001); M. Brandl, L. Grosse-Hovest, E. Holler, H. J. Kolb, G. Jung, Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma. *Exp Hematol* **27**, 1264-1270 (1999)); однако ранняя технология, доступная в то время, требовала химического перекрестного связывания или гибридных/гибридомных слияний для создания предлагаемых биотерапевтических средств и привела к получению субоптимальных реагентов, которые обладали значительной собственной активностью, независимо от их кластеризации на опухолевых клетках (аналогично обычным CD28-антителам, предположительно из-за неспецифичной агрегации этих биспецификов). Более того, эти ранние подходы также требовали предварительной активации Т-клеток *in vitro*, чтобы наблюдать какую-либо противоопухолевую активность

in vivo. В совокупности катастрофические клинические результаты при применении CD28-активирующего антитела TGN1412, а также ограничения ранних CD28-биспецифичных подходов воспрепятствовали дальнейшему изучению этих подходов.

[00260] В настоящем документе описан новый класс костимулирующих биспецифичных антител к CD28, которые могут заметно и безопасно стимулировать противоопухолевую активность, обеспечивая костимулирующий «сигнал 2». Эти CD28-биспецифики сами по себе обладают ограниченной активностью (в отсутствие «сигнала 1»), но могут заметно усиливать противоопухолевую активность в условиях «сигнала 1», что может быть обеспечено путем применения этих CD28-биспецификов в паре с развивающимся классом CD3-биспецификов (или если эти CD28-биспецифики используются в условиях, при которых уже присутствуют эндогенные популяции опухолеспецифичных Т-клеток). Создание, тестирование и успех этого нового CD28-биспецифичного подхода зависели от (1) использования новой биспецифичной платформы, которая была первоначально разработана для получения CD3-биспецификов и которая недавно была подтверждена как технологически (E. J. Smith *et al.*, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)), так и клинически (A. Crawford *et al.*, REGN4018, a novel MUC16xCD3 bispecific T-cell engager for the treatment of ovarian cancer. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018*, (2018)) (Clinicaltrials.gov: NCT02290951, Clinicaltrials.gov: NCT03564340) для этих CD3-биспецификов, и которая затем была адаптирована для эффективного получения CD28-биспецификов, проявляющих минимальную активность в отсутствие специфического «сигнала 1»; (2) разработки нескольких ксеногенных и сингенных генетически гуманизированных (D. M. Valenzuela *et al.*, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 652-659 (2003); W. T. Poueymirou *et al.*, F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* **25**, 91-99 (2007)) моделей опухолей на животных для оценки этих CD28-биспецификов по отдельности и в комбинации с CD3-биспецификами; и (3) в сочетании с гораздо более глубокими знаниями о синдроме высвобождения цитокинов и его клиническом развитии (A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018); D. W. Lee *et al.*, Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188-195 (2014); C. L. Bonifant, H. J. Jackson, R. J. Brentjens, K. J. Curran, Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* **3**, 16011 (2016)) валидации модели на обезьянах, в которой любую потенциальную токсичность этих CD28-биспецификов можно сравнить с токсичностью обычных CD28-активирующих антител.

[00261] В настоящем документе описано получение и тестирование костимулирующих биспецифичных антител к TSAxCD28, нацеленных на TSA, для лечения рака яичников (MUC16xCD28). Было показано, что в отсутствие «сигнала 1» эти CD28-биспецифики обладают минимальной активностью *in vitro* или *in vivo*. Однако эти CD28-

биспецифики можно применять в паре с CD3-биспецификами для образования искусственных «иммунных синапсов», содержащих опухолевые антигены, а также комплексы TCR и CD28. Более того, в паре с подходящими CD3-биспецификами *in vitro* эти CD28-биспецифики могут эффективно и специфично способствовать активации Т-клеток и уничтожению опухолевых клеток антиген-зависимым образом. Кроме того, эти CD28-биспецифики также эффективно усиливают противоопухолевую активность CD3-биспецификов *in vivo* зависимым от опухолевого антигена образом в моделях ксеногенных и сингенных опухолей; в таких моделях CD28-биспецифики обладают минимальной активностью в виде единственного агента, кроме тех случаев, когда уже присутствуют опухолеспецифичные Т-клетки, и в таких условиях они, по-видимому, усиливают эту специфичную активность зависимым от опухолевого антигена образом. Кроме того, комбинированная терапия TSAxCD28 и TSAxCD3 значительно стимулирует экспансию внутриопухолевого фенотипа активированных Т-клеток/Т-клеток памяти *in vivo*. Наконец, токсикологические исследования на генетически гуманизированных иммунокомпетентных мышах, а также на яванских макаках демонстрируют, что эти биспецифики проявляют ограниченную активность и не обладают токсичностью в виде единственных агентов, при непосредственном сравнении с обычными CD28-активирующими антителами.

[00262] Часто характеристика клинических препаратов-кандидатов, специфичных для человека, в области иммуноонкологии ограничивается тестированием на моделях ксеногенных опухолей с привитыми иммунными клетками человека. Несмотря на то, что эти ксеногенные модели (например, используемая модель OVCAR3) могут быть очень полезными, они имеют ограничения. Мыши, используемые в таких ксеногенных моделях, не экспрессируют человеческую опухолевую мишень в своих нормальных тканях, тем самым препятствуя оценке тестируемого агента в условиях нормальной тканевой экспрессии мишени. Действительно, если мишень обычно также экспрессируется на высоких уровнях в нормальных тканях, это может ограничить противоопухолевую эффективность за счет отклонения тестируемого агента от опухоли и может привести к токсичности для этих нормальных тканей - ничего из этого нельзя оценить в ксеногенной модели. Дополнительное ограничение может заключаться в активности привитых моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека, перенесенных иммунодефицитной мыши, которая может отличаться от активности нормальных Т-клеток хозяина, присутствующих в иммунокомпетентной системе. Чтобы преодолеть эти ограничения и обеспечить улучшенные модели для тестирования клинических препаратов-кандидатов, специфичных для человека, в настоящем изобретении были созданы дважды и трижды генетически гуманизированные мыши. В этих моделях опухолевые антигены были генетически гуманизированы, чтобы обеспечить их нормальную экспрессию в подходящих тканях хозяина (для MUC16), а компоненты CD3 и/или CD28 были генетически гуманизированы, чтобы обеспечить ответы иммунокомпетентных клеток хозяина на специфичные для человека клинические препараты-кандидаты. В этих генетически гуманизированных иммунокомпетентных сингенных моделях на животных было

обнаружено, что, как и в ксеногенных моделях на животных, CD28-биспецифики к опухолевой мишени MUC16 усиливали противоопухолевую активность соответствующих им CD3-биспецификов. Подобное повышение противоопухолевой эффективности различными биспецификами TSAxCD28 (например, MUC16 и PSMA (данные не показаны)) в нескольких доклинических моделях дает основания полагать, что этот терапевтический метод является надежным и не ограничивается конкретной опухолевой моделью, и может иметь более широкое применение в качестве нового класса нацеленной иммунотерапевтической комбинации. В целом, результаты обращают внимание на то, что биспецифики TSAxCD28 могут действовать синергически с биспецификами TSAxCD3 и могут обеспечить биологическое решение, которое может заметно повысить эффективность хорошо исследованных биспецификов TSAxCD3 достаточно безопасным и хорошо переносимым образом, что оправдывает тестирование в исследованиях на людях.

[00263] Биспецифики TSAxCD3 представляют собой многообещающий развивающийся класс иммунотерапии, но во многих случаях, несомненно, будет необходима дальнейшая оптимизация противоопухолевой активности. Подобно тому, как в CAR-T-клеточных подходах использовали химерные рецепторы, которые искусственно активируют как «сигнал 1», так и «сигнал 2», чтобы улучшить их противоопухолевую активность (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); S. L. Maude *et al.*, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448 (2018)), в данном изобретении показано потенциальное преимущество комбинирования CD3-спецификов (которые обеспечивают «сигнал 1») с CD28-биспецификами (которые обеспечивают «сигнал 2») для усиления противоопухолевой активности. В дополнение к практическим преимуществам, которые такой подход может иметь по сравнению с CAR-T-клеточной терапией, заключающимся в том, что он не требует трудоемкой подготовки клеточной терапии, которая должна быть индивидуально адаптирована для каждого пациента, а также не требует предварительного прохождения пациентами «лимфодеплеции» путем токсической химиотерапии, чтобы они могли получать такую клеточную терапию, часто связанной с побочными действиями (A. Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018); C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)), биспецифичный подход в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает возможность повышения эффективности, а также повышения безопасности и специфичности действия. Таким образом, можно воспользоваться преимуществом «сочетательного нацеливания», комбинируя CD3-биспецифик к одному антигену с CD28-биспецификом, специфичным ко второму антигену - повышенная эффективность будет иметь место только на опухолевых клетках, экспрессирующих оба антигена - таким образом, фокусируя уничтожение Т-клетками только на опухолевых клетках, экспрессирующих оба антигена, при ограничении «нецелевой токсичности» в нормальных тканях, экспрессирующих только один из

антигенов. В совокупности данные, представленные в настоящем документе, демонстрируют, что комбинирование биспецификов на основе CD28 с биспецификами на основе CD3 может обеспечить хорошо переносимые, готовые к использованию биологические решения с заметно усиленной и синергической противоопухолевой активностью. Первоначальная проверка этой возможности в исследованиях на людях состоится в этом году.

Пример 9. MUC16xCD28 по отдельности или в виде комбинированной терапии не индуцирует системную активацию Т-клеток по сравнению с суперагонистом к CD28 у яванских макак

[00264] Примерные антитела MUC16xCD28 согласно настоящему изобретению стимулируют активацию Т-клеток яванских макак с помощью MUC16xCD3 (**Фигуры 2F-2H**). Для определения безопасности и переносимости примерных биспецифичных антител к MUC16xCD28 согласно настоящему изобретению по отдельности или в комбинации с антителом к MUC16xCD3 выполняли исследование токсичности однократной дозы на яванских макаках. Самок или самцов яванских макак распределяли по группам лечения, как указано в **Таблице 27**.

[00265] Исследование на яванских макаках проводили в соответствии с рекомендациями IACUC (Институционального комитета по содержанию и использованию животных). Самцы яванских макак (по 3 животных/группу) получали однократную дозу каждого исследуемого препарата посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно 30 минут (комбинированное лечение вводили в виде отдельной инфузии в течение в общей сложности 1 часа). Оценка токсичности основывалась на клинических наблюдениях, качественных показателях потребления корма, массе тела, неврологических обследованиях, показателях жизненно важных функций (температура тела, частота сердечных сокращений, пульсоксиметрия и частота дыхательных движений), а также лабораторной диагностике и патологической анатомии. Были собраны образцы крови и тканей для анализа на цитокины, иммунофенотипического анализа, гистопатологии и токсикокинетической оценки. Уровни СРБ анализировали на системе Roche Modular P 800. Цитокины измеряли с помощью Meso Scale Diagnostics (MSD, Роквилл, Мэриленд). Для исследования периферической крови с помощью проточной цитометрии кровь собирали в пробирки с калием и ЭДТА, лизировали, окрашивали антителом к CD3, антителом к Ki67 и антителом к ICOS (BD Biosciences) и анализировали с помощью FACS Canto II.

[00266] Животные получали однократную дозу каждого тестируемого изделия путем внутривенной инфузии в течение приблизительно 30 минут (комбинированное лечение вводили в виде отдельной инфузии в течение в общей сложности 1 часа). Оценка токсичности основывалась на клинических наблюдениях, качественных показателях потребления корма, массе тела, неврологических обследованиях, показателях жизненно важных функций (температура тела, частота сердечных сокращений, пульсоксиметрия и частота дыхательных движений), а также лабораторной диагностике и патологической анатомии. Были собраны образцы крови для анализа на цитокины, иммунофенотипического

анализа методом FACS и токсикокинетической оценки. Не наблюдали значительного высвобождения цитокинов, маргинализации Т-клеток или положительной регуляции маркера активации Т-клеток после введения однократной дозы примерного антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению при 1 или 10 мг/кг, MUC16хCD3 при 1 или 10 мг/кг или комбинированных обработок. В **Таблице 27** обобщены различные показания, включая абсолютное количество Т-клеток, маркер активации Т-клеток (ki67), уровни СРБ и цитокинов в сыворотке из крови, полученной в указанный момент времени от отдельных животных. Кроме того, эти результаты были подтверждены с помощью анализов пролиферации Т-клеток человека с использованием метода сухого или влажного покрытия, которые продемонстрировали, что закрепление MUC16хCD28 на аналитических планшетах с использованием метода сухого или влажного покрытия не индуцирует активацию Т-клеток в отсутствие стимула CD3 в отличие от антитела-суперагониста к CD28 (**Фигура 7**). Действительно, было обнаружено, что примерные биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению, а также исходные двухвалентные антитела к CD28 не смогли индуцировать пролиферацию Т-клеток человека по сравнению с антителом-суперагонистом к CD28. В целом поисковое исследование токсичности однократной дозы на обезьянах и анализы на основе Т-клеток человека *in vitro* дают основания полагать, что примерные биспецифичные антитела к MUC16хCD28 согласно настоящему изобретению безопасны и хорошо переносятся.

Таблица 27. Обобщенные данные токсикологического исследования на яванских макаках

Молекула	Описание	Доза (мг/кг)	№ животно го	День 1 - клиничес кие набл-я	Люб ые набл- я			Т-клетки Кі67+ (ЕЗ/мкл)		СРБ (мг/дл)	Цитокины плазмы через 5 часов после введения дозы (пг/мл)						
						(ЕЗ/мкл)											
					Дни 2-4	Пред в-й тест	5 ч	Пред в-й тест	72 ч	24 ч	IL-6	IL-8	IL-10	IFN-g	TNF- α	IL-2	IL-4
REGN401 8	Антитело к Muc16xCD 3 (hIgG4)	1	1501	-	-	2,28	1,67	0,11	0,10	13,8	10	2	3	BLQ	BLQ	7	BLQ
			1502	-	-	3,12	1,71	0,25	0,29	7,9	24	2	4	BLQ	4	BLQ	BLQ
			1503	-	-	3,84	1,58	0,21	0,17	6	5	2	BLQ	BLQ	BLQ	3	BLQ
bs24963D	Антитело к MUC16xC D28 (hIgG4)	1	2501	-	-	3,07	2,40	0,13	0,20	0,4	3	3	BLQ	BLQ	4	3	BLQ
			2502	-	-	1,97	2,73	0,10	0,15	0,1	4	3	3	BLQ	4	4	BLQ
			2503	-	-	1,64	3,05	0,10	0,19	0,2	7	3	4	46	6	4	BLQ
REGN401 8+bs24963 D	Антитело к Muc16xCD 3+антитело к MUC16xC D28	1+1	3501	-	-	2,89	1,98	0,19	0,10	13,3	24	3	4	47	4	13	BLQ
			3502	-	-	1,62	1,18	0,10	0,06	13,3	22	3	BLQ	80	5	7	BLQ
			3503	-	-	1,80	1,37	0,10	0,09	9,8	7	BLQ	BLQ	BLQ	4	9	BLQ
REGN401 8	Антитело к Muc16xCD 3 (hIgG4)	10	4501	-	-	2,48	0,89	0,13	0,12	14,2	11	4	4	28	4	3	BLQ
			4502	-	-	1,16	0,52	0,10	0,12	7,6	7	4	4	31	BLQ	6	BLQ
			4503	-	-	3,75	1,01	0,23	0,21	2,5	5	4	4	38	4	4	BLQ
bs24963D	Антитело к MUC16xC D28 (hIgG4)	10	9501	-	-	1,86	2,91	0,09	0,17	0,1	4	4	4	BLQ	5	3	BLQ
			9502	-	-	0,57	0,96	0,04	0,07	0,2	9	4	4	BLQ	BLQ	4	BLQ
			9503	-	-	1,49	2,98	0,18	0,19	0,5	7	4	5	BLQ	4	3	BLQ
REGN401 8+bs24963 D	Антитело к Muc16xCD 3+антитело к MUC16xC	10+10	6501	-	-	3,58	0,75	0,21	0,09	14,3	31	5	3	BLQ	BLQ	7	BLQ
			6502	-	-	3,98	1,29	0,31	0,29	14,6	73	5	3	BLQ	BLQ	38	BLQ
			6503	-	-	2,01	0,79	0,17	0,10	5,3	7	3	3	BLQ	4	BLQ	BLQ

	D28																
REGN4018+bs24963 D	Антитело к Muc16xCD3+антитело к MUC16xC D28	1+10	5501	-	-	1,70	1,37	0,14	0,23	14,2	6	4	4	36	BLQ	6	BLQ
			5502	-	-	3,11	3,24	0,18	0,17	5,5	7	5	4	BLQ	BLQ	4	BLQ
			5503	-	-	2,38	1,85	0,20	0,19	6,2	31	4	4	BLQ	BLQ	2	BLQ
REGN4018+bs24963 D	Антитело к Muc16xCD3+антитело к MUC16xC D28	1+1, повторное дозирование	8501	-	-	3,36	1,04	0,26	0,05	14,4	12	4	4	BLQ	3	11	BLQ
			8502	-	-	2,49	2,09	0,14	0,06	11,7	9	4	5	BLQ	5	7	BLQ
			8503	-	-	5,93	4,73	0,31	0,15	14,6	25	4	4	BLQ	4	4	BLQ
BLQ: ниже предела количественного определения																	
LLOQ (нижний предел количественного определения): IFN-g=37 пг/мл; TNF-a=3 пг/мл; IL-2=2,4 пг/мл; IL-6=2 пг/мл; IL-8=1,7 пг/мл; IL-4=1,8 пг/мл; IL-10=3 пг/мл																	

[00267] Были собраны образцы крови для анализа на цитокины и иммунофенотипического анализа методом проточной цитометрии. Несмотря на то, что введенный обезьянам CD28-SA индуцировал значительное высвобождение цитокинов, скопление лимфоцитов по краю воспаления и активацию Т-клеток, примечательно, что после введения MUC16xCD28 не наблюдали высвобождения цитокинов, скопления Т-клеток по краю воспаления или активации Т-клеток (**Фигуры 8А-8С и Таблица 27**). В целом, эти предварительные наблюдения свидетельствуют о том, что биспецифики TSAxCD28 хорошо переносятся у приматов и не индуцируют высвобождение цитокинов и активацию Т-клеток, как это наблюдается в случае CD28-SA (данные не показаны). Следует отметить, что предыдущие исследования с применением CD28-SA на обезьянах не смогли предсказать значительное высвобождение цитокинов и активацию Т-клеток, наблюдаемые у человека (Tegenaro AG, www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf), и это было связано с более низкой экспрессией CD28 у обезьян (D. Eastwood *et al.*, Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4⁺ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* **161**, 512-526 (2010)). Несмотря на то, что исследования переносимости на яванских макаках, возможно, не позволят предсказать CRS у человека, сильные сигналы, отмеченные при применении CD28-SA у обезьян, свидетельствуют о том, что это было упущено Tegenaro *et al.*, просто поскольку они не исследовали соответствующие ранние временные точки, в которых эти ответы могут быть надежно обнаружены.

Пример 10: Связывание bs24963D (антитело к MUC16xCD28, также упоминаемое как REGN5668) и REGN4018 (MUC16xCD3) с линиями клеток, экспрессирующими MUC16 человека или яванской макаки, с первичным клеткам из МКПК человека или яванской макаки и с линией Т-клеток

Материалы и методы - краткое изложение экспериментальных методик

[00268] Анализ методом проточной цитометрии использовали для определения связывания bs24963D с линиями клеток рака яичников человека (OVCAR-3 и PEO1), эндогенно экспрессирующими MUC16 человека, а также связывания bs24963D и REGN4018 с клетками мыши ID8, модифицированными для экспрессии MUC16 человека или яванской макаки, с клетками 3Т3, модифицированными для экспрессии MUC16 человека, Т-клетками человека и яванской макаки, а также модифицированной репортерной линией Т-клеток.

[00269] В общих чертах, 1×10^5 клеток/лунку инкубировали в течение 30 минут при 4°C с последовательным разведением антител, включая bs24963D, REGN4018 и контрольные антитела (несоединяющее контрольное МАТ IgG4^{P-PVA}, несоединяющее контрольное биспецифичное антитело к CD28 или исходные контрольные антитела к CD28 или CD3).

[00270] Разведения антител варьировались от 12,2 пМ до 200 нМ для первичных Т-клеток человека и яванской макаки и модифицированных репортерных Т-клеток, в то время для MUC16⁺ клеток-мишеней выбрали от 8,1 пМ до 133 нМ.

[00271] После инкубации клетки дважды промывали холодным ФСБ, содержащим 1% профильтрованной ФБС, с последующим детектированием с применением меченого фикоэритрином (ФЭ) антитела к IgG человека (MUC16⁺ клетки) или меченого Alexa647 антитела к IgG человека (CD28⁺ клетки).

[00272] К Т-клеткам человека и яванской макаки добавляли краситель для определения жизнеспособности клеток, чувствительный к ближнему ИК-диапазону (IR). Лунки, не содержащие антитела или содержащие только вторичное антитело, использовали в качестве контроля.

[00273] После инкубации с MUC16⁺ клетками или линией клеток J.RT3.T3.5/NF-κB-Luc/1G4AB/hCD8αβ/hCD28 клетки промывали, повторно суспендировали в 200 мкл буфера для FACS (холодный ФСБ, содержащий 1% профильтрованной ФБС и 1 mM ЭДТА) и анализировали с помощью проточной цитометрии на BD FACS Canto II.

[00274] После инкубации с Т-клетками человека или яванской макаки клетки промывали и окрашивали смесью антител к CD2, к CD16, к CD4 и к CD8 в буфере для FACS в течение 20 минут при 4°C. После промывки клетки повторно суспендировали в буфере для FACS, гейтировали по гейту живые/CD2⁺/CD4⁺/CD16⁻ или живые/CD2⁺/CD8⁺/CD16⁻ и анализировали с помощью проточной цитометрии на BD LSRFortessa X-20.

[00275] Для определений ЭК₅₀ измеренные значения СИФ анализировали с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 9-точечной кривой ответа с использованием GraphPad Prism. Кратное увеличение максимальной СИФ определяли путем получения отношения самой высокой детектированной СИФ к СИФ лунок, содержащих только вторичное антитело.

[00276] Проточную цитометрию также использовали для определения связывания bs24963D и коммерческого антитела к PD-L1 с MUC16⁺ клетками рака поджелудочной железы человека, клетками SW1990 и SW1990/hPD-L1. В общих чертах, 2×10⁵ клеток инкубировали с 5 мкл (66,7 nM) bs24963D, антитела к PD-L1 (2,5 мкл) или несоединяющего контрольного антитела, конъюгированных с AlexaFluor647 (bs24963D) или APC (антитело к PD-L1), и инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки промывали один раз буфером для окрашивания, центрифугировали и промывали ДФСБ. Клетки окрашивали с использованием 100 мкл фиксируемого фиолетового красителя для оценки жизнеспособности клеток, разведенного 1:1000, и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза в буфере для окрашивания, повторно суспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания и раствора цитофикса в соотношении 1:1 и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием цитометра Cytoflex. Зависимость кратности связывания от жизнеспособности рассчитывали путем деления СИФ интересующего антитела на СИФ при оценке жизнеспособности по отдельности.

Материалы и методы

Биотест NF-κB с использованием люциферазы как репортера

[00277] Способность bs24963D усиливать передачу сигналов, опосредуемую TCR, оценивали в клеточном репортерном анализе на основе модифицированных Т-клеток/антигенпрезентирующих клеток, как показано на **Фигуре 10**. TCR распознают специфические комплексы ГКГС/пептид и активируют Т-клетки за счет множества факторов транскрипции, таких как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор-усилитель легкой каппа - цепи - активированных В-клеток (NF-κB) (Goldrath, 1999; Nature 402:255-62) (Shapiro, 1998; J. Immunology; 161(12):6455-8). Т-клеточный ответ дополнительно оптимизируется за счет задействования костимулирующих рецепторов, таких как CD28, который, в свою очередь, активируется его эндогенными лигандами, CD80 или CD86, и впоследствии усиливает клеточные сигналы, такие как пути, контролируемые фактором транскрипции NF-κB, после активации TCR.

[00278] В этом анализе модифицированные Т-клетки непосредственно активируют за счет 1G4 TCR (1G4AB), который распознает пептид NY – ESO-1 157-165 (NYESO1p) в комплексе с молекулой ГКГС класса I человека, HLA-A2, и hβ2M, экспонируемыми на модифицированных антигенпрезентирующих клетках 3T3 (Robbins, 2008; J. of Immunology; 180(9): 6116-31). Активация TCR приводит к выработке люциферазы, которая запускается фактором транскрипции NF-κB в модифицированных репортерных Т-клетках. CD8 облегчает взаимодействие TCR/ГКГС и способствует активации Т-клеток путем привлечения специфической для лимфоцитов тирозиновой протеинкиназы (Lck) к комплексу TCR/CD3, усиливая посредством этого передачу сигналов TCR посредством фосфорилирования внутриклеточных иммунорецепторных активирующих мотивов на основе тирозина (ITAM) (Cole, 2012; Immunology; 137(2):139-48) (Guirado, 2002; Biochem. Biophys. Res. Comm. 291(3):574-81).

[00279] Двукратные последовательные разведения bs24963D, несоединяющего контроля (не-ТААхCD28 биспецифичного антитела) или несоединяющего контроля (от 39 пМ до 10 нМ) добавляли с двумя повторами к 5×10^4 модифицированных репортерных Т-клеток (J.RT3.T3.5/NF-κB-Luc/1G4AB/hCD8αβ/hCD28) на лунку в присутствии $1,5 \times 10^4$ антигенпрезентирующих клеток, которые представляли собой либо MUC16⁻ (3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p), либо MUC16⁺ (3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16). Разведения антител и биотест выполняли в полных средах (RPMI с добавлением 10% ФБС и смеси пенициллина, стрептомицина и L-глутамин). Лунки, не содержащие антитела, включали в качестве дополнительных контролей и использовали для расчета кратного увеличения активности и значений ЭК₅₀. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 часов, а затем в каждую лунку добавляли субстрат люциферазы ONE-Glo (100 мкл). Активность люциферазы регистрировали как сигнал люминесценции, выраженный в

относительных световых единицах (RLU), с использованием считывающего устройства для планшетов ENVISION. Детектированные значения RLU анализировали с помощью 4-параметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой ответа с использованием GraphPad Prism.

[00280] Максимальный сигнал активации определяли как средний максимальный ответ RLU, детектированный в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела. Кратное увеличение активности рассчитывали как соотношение самого высокого среднего значения RLU, зарегистрированного в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела, и среднего значения RLU, зарегистрированного в отсутствие антитела.

Анализ активации Т-клеток для исследования пролиферации Т-клеток и высвобождения IL-2

[00281] Способность bs24963D опосредовать высвобождение IL-2 и пролиферацию Т-клеток в присутствии постоянной концентрации REGN4018 (согласно оценке в линиях клеток рака яичников человека OVCAR-3 и PEO1) или в присутствии постоянной концентрации цемиплимаба (согласно оценке в линиях клеток рака поджелудочной железы человека [SW1990 и SW1990/hPD-L1]) определяли с использованием анализов активации Т-клеток с обогащенными первичными Т-клетками человека от 3 или 2 доноров, соответственно.

Выделение первичных Т-клеток человека

[00282] МКПК человека выделяли из лейкоцитарных концентратов, полученных от 4 здоровых доноров. Для доноров 555014 и 555109 МКПК выделяли из периферической крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности. В общих чертах, в конические пробирки объемом 50 мл вносили 15 мл Ficoll Plaque Plus, а затем поверх наслаивали 30 мл крови, разведенной в соотношении 1:1 ФСБ, содержащим 2% ФБС. После 30-минутного центрифугирования при 400×g, с выключенным тормозом, слой моноклеарных клеток переносили в свежую пробирку, разводили в 5 раз ФСБ, содержащим 2% ФБС, и центрифугировали в течение 8 минут при 300×g. Для доноров 555131 и 555129 МКПК выделяли из периферической крови здорового донора с использованием набора для выделения МКПК человека EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit от Stem Cell Technologies в соответствии с протоколом производителя. Выделенные МКПК замораживали в ФБС, содержащей 10% ДМСО. Для выделения CD3⁺ Т-клеток замороженные флаконы с МКПК размораживали на водяной бане при 37°C и разводили в стимулирующих средах (среды для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% ФБС, HEPES, NaPyт, NEAA и 0,01 мМ β-меркаптоэтанола [BME]), содержащих 50 Ед./мл нуклеазы бензоназы®. Клетки центрифугировали при 1200 об./мин в течение 10 минут, повторно суспендировали в буфере EasySep и выделяли с использованием набора EasySep T-Cell Isolation от StemCell Technologies, следуя протоколу производителя.

Анализ активации Т-клеток с использованием клеток человека OVCAR-3, PEO1, SW1990, SW1990/hPD-L1 и первичных Т-клеток человека

[00283] CD3⁺ Т-клетки, повторно суспендированные в стимулирующих средах (среды для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% ФБС, HEPES, NaPyr, NEAA и 0,01 мМ BME), высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунку. Клетки OVCAR-3, PEO1, SW1990 или SW1990/hPD-L1 обрабатывали 25 мкг/мл (OVCAR-3), 10 мкг/мл (PEO1) или 30 мкг/мл (SW1990 и SW1990/hPD-L1) митомицина С, чтобы остановить пролиферацию. После инкубации в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂, обработанные митомицином С клетки промывали 3 раза ДФСБ, содержащим 2% ФБС, с последующим окончательным ресуспендированием в стимулирующих средах. Клетки OVCAR-3, PEO1, SW1990 и SW1990/hPD-L1 добавляли в лунки, содержащие CD3⁺ Т-клетки в конечной концентрации 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ клеток или 5×10^4 клеток, соответственно, для OVCAR-3, PEO1 и обеих линий клеток SW1990. В лунки, содержащие клетки OVCAR-3, PEO1, SW1990 или SW1990/hPD-L1, добавляли постоянную концентрацию REGN4018 или несоединяющего контрольного биспецифичного антитела к CD3 (5 нМ) или цемиплимаба или несоединяющего контрольного IgG4^P (20 нМ). Впоследствии bs24963D, не-ТААхCD28 контроль или несоединяющие контрольные антитела титровали от 7,6 пМ до 500 нМ в ряде разведений 1:4 и добавляли в лунки. Конечная точка 10-точечной концентрационной кривой не содержала антитела и использовалась для расчета кратного увеличения активности. После инкубации планшетов в течение 72 (OVCAR-3 и PEO1) или 96 часов (SW1990 и SW1990/hPD-L1) при 37°C, 5% CO₂, по 50 мкл супернатанта сред собирали для измерения высвобождения IL-2 до обработки [метил-³H]-тимидином для количественной оценки пролиферации.

[00284] Для оценки высвобождения IL-2 5 мкл (для анализов с использованием клеток OVCAR-3 и PEO1) или 20 мкл (для анализов с использованием клеток SW1990 и SW1990/hPD-L1) супернатанта тестировали с использованием набора AlphaLISA для IL-2 человека в соответствии с протоколом производителя. Измерения IL-2 регистрировали на многоканальном считывающем устройстве для планшетов Envision от Perkin Elmer и представляли в виде относительных единиц флуоресценции (RFU).

[00285] Для анализов пролиферации в лунки добавляли по 50 мкл [метил-³H]-тимидина, разведенного до 2 мКи/мл в стимулирующих средах, и планшеты инкубировали либо в течение 6 часов (для анализов с использованием клеток OVCAR-3 и PEO1), либо в течение 16 часов (для анализов с использованием клеток SW1990 и SW1990/hPD-L1). [Метил-³H]-тимидин будет в больших количествах включен в делящиеся клетки. После инкубации клетки собирали на фильтровальные планшеты и подготавливали для измерения на сцинтилляционном и люминесцентном считывающем устройстве TopCount NXT для микропланшетов.

[00286] Все последовательные разведения тестировали с тремя повторами для оценки высвобождения IL-2 и пролиферации. Значения ЭК₅₀ антител определяли на основании 4-параметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой доза-ответ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Максимальные уровни высвобождения IL-2 и пролиферации представлены как средний максимальный

ответ, детектированный в пределах протестированного диапазона доз. Кратное увеличение максимального высвобождения IL-2 или пролиферации Т-клеток, опосредуемых bs24963D, рассчитывали относительно максимального высвобождения IL-2 или пролиферации, опосредуемых отсутствием антитела.

[00287] Способность bs24963D активировать Т-клетки оценивали в анализе, в котором стимулирующие антигенпрезентирующие клетки обеспечивают сигнал 1. В этом анализе использовали репортерные Т-клетки J.RT3.T3.5, модифицированные для экспрессии CD8 человека, CD28 человека, описанного в литературе TCR (1G4), который распознает пептид NY-ESO-1 (NYESO1p) в комплексе с HLA-A2, и репортера NF-κB-люцифераза. Стимулирующие антигенпрезентирующие клетки, обеспечивающие сигнал 1, представляли собой клетки 3T3, модифицированные для экспрессии HLA-A2, hβ2M и NYESO1p с MUC16 человека (hMUC16) или без него. Несоединяющее контрольное биспецифичное антитело к CD28 (не-ТААхCD28) и несоединяющее контрольное МАТ (IgG4^{P-PVA}) тестировали параллельно с bs24963D. Передачу сигналов NF-κB измеряли с использованием люминесцентного реагента для детектирования активности репортерной люциферазы. Результаты обобщены в **Таблице 28**.

[00288] В этой тестовой системе bs24963D опосредовал зависимое от концентрации увеличение передачи сигналов NF-κB в репортерных Т-клетках в присутствии MUC16⁺ антигенпрезентирующих клеток; при использовании клеток, лишенных экспрессии MUC16 (**Фигуры 11А и 11В**), активность не наблюдалась. При использовании несоединяющего контрольного биспецифичного антитела к CD28 увеличение передачи сигналов NF-κB не наблюдалось.

Таблица 28: Обобщенные данные по bs24963D-опосредуемой активации NF-κB-люциферазы

Антитело	Антигенпрезентирующие клетки (+/- MUC16)					
	3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p/hMUC16			3T3/hβ2M/HLA-A2/NYESO1p		
	ЭК ₅₀ (M)	Макс. RLU ^a	Кратное увеличение	ЭК ₅₀ (M)	Макс. RLU ^a	Кратное увеличени е
bs24963D	2,88×10 ⁻¹⁰	254300	2,11	ND	65920	1,00
He- ТААхCD28	ND	133220	1,24	ND	64740	1,02

^a Максимальное значение RLU представляет собой самое высокое среднее значение RLU, наблюдаемое в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела (от 39 пМ до 10 нМ).

^b Кратное увеличение максимального значения RLU, опосредуемого bs24963D или не-ТААхCD28, рассчитывали относительно максимального значения RLU, опосредуемого отсутствием антитела.

Сокращения: ND, не определено, поскольку не было обнаружено зависимое от концентрации увеличение активности люциферазы.

Пример 11. Оценка bs24963D-опосредуемого (анти-MUC16 X анти-CD28) высвобождения IL-2 и пролиферации первичных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие REGN4018 (анти-MUC16 X анти-CD3) или цемиплимаба (антагонистическое антитело к PD-1)

[00289] Способность bs24963D активировать первичные Т-клетки человека, как определено по высвобождению IL-2 и пролиферации Т-клеток, оценивали в присутствии 2 различных MUC16⁺ линий клеток рака яичников человека (OVCAR-3 и PEO1). Поскольку эти клетки не обеспечивают достаточный сигнал 1 от аллогенного ответа, для обеспечения сигнала 1 включали фиксированную концентрацию REGN4018 (биспецифичное антитело к MUC16хCD3). Результаты для клеток OVCAR-3 и PEO1 обобщены в **Таблице 29** для высвобождения IL-2 и в **Таблице 30** для пролиферации.

[00290] Способность bs24963D активировать первичные Т-клетки человека, как определено по высвобождению IL-2 и пролиферации Т-клеток, оценивали в присутствии MUC16⁺ линии клеток рака поджелудочной железы человека (SW1990) и SW1990, модифицированной для сверхэкспрессии PD-L1 человека (SW1990/hPD-L1). Обе линии клеток обеспечивают аллогенный ответ, которого достаточно, чтобы служить сигналом 1. Кроме того, также оценивали способность фиксированных концентраций цемиплимаба (20 нМ) усиливать эффекты bs24963D. Результаты для клеток SW1990 и SW1990/hPD-L1 обобщены в **Таблице 31** для высвобождения IL-2 и в **Таблице 32** для пролиферации.

Способность bs24963D (REGN5668) усиливать высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека и их пролиферацию в присутствии или в отсутствие REGN4018 с клетками-мишенями OVCAR-3 и PEO1

[00291] При инкубации с раковыми клетками OVCAR-3 и PEO1 bs24963D опосредовал зависимое от концентрации усиление высвобождения IL-2 из Т-клеток человека (**Фигура 12**) и их пролиферацию (**Фигура 13**) только в присутствии REGN4018. Несоединяющие контрольные биспецифичные антитела к CD3 и к CD28 не усиливали высвобождение IL-2 ни в присутствии, ни в отсутствие REGN4018.

[00292] В этом анализе 5 нМ REGN4018 по отдельности не увеличивал высвобождение IL-2, но показал умеренное усиление пролиферации Т-клеток по сравнению с несоединяющим контролем.

Таблица 29: Обобщенные данные по bs24963D-опосредуемому усилению высвобождения IL-2 из первичных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие REGN4018 с клетками-мишенями OVCAR-3 и PEO1

Линия клеток- мишене й	Доно р	Антитело в фиксированн ой концентрации (5 нМ)	Антитело, протестированн ое в различных концентрациях (от 7,6 пМ до 500 нМ)	Высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека		
				ЭК ₅₀ (М)	Мак с. IL-2 ^a (RF U)	Кратное увеличени е ^b (IL-2)
OVCAR -3	Донор 55501 4	REGN4018	bs24963D	7,07×10 ⁻¹⁰	4693 1	20,01
			He-TAAxCD28	NC	4741	1,89
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	1361	2,75
			He-TAAxCD28	NC	3033	6,62
	Донор 55510 9	REGN4018	bs24963D	1,22×10 ⁻⁹	3672 5	32,10
			He-TAAxCD28	NC	1638	1,38
		He-TAAxCD3	bs24963D	ND	893	1,82
			He-TAAxCD28	NC	1403	2,84
	Донор 55513 1	REGN4018	bs24963D	5,90×10 ⁻¹⁰	4620 9	13,08
			He-TAAxCD28	NC	4443	1,33
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	1814	2,71
			He-TAAxCD28	NC	3136	5,95
PEO1	Донор 55501 4	REGN4018	bs24963D	1,95×10 ⁻⁹	3102 4	30,30
			He-TAAxCD28	NC	2312	2,16
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	2490	5,56
			He-TAAxCD28	NC	2776	6,12
	Донор 55510 9	REGN4018	bs24963D	3,10×10 ⁻⁹	1642 1	20,03
			He-TAAxCD28	ND	897	1,33
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	2039	4,36
			He-TAAxCD28	NC	1360	2,35
	Донор 55501 4	REGN4018	bs24963D	2,42×10 ⁻⁹	2921 7	25,70
			He-TAAxCD28	NC	2175	1,82
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	2911	5,77
			He-TAAxCD28	NC	2443	4,42

^a Максимальная концентрация IL-2 представляет собой самое высокое среднее значение концентрации IL-2, зарегистрированное в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела.

^b Кратное увеличение максимального высвобождения IL-2, опосредуемого bs24963D в присутствии или в отсутствие REGN4018, рассчитывали относительно максимального высвобождения IL-2, опосредуемого отсутствием антитела.

Сокращения: NC, не рассчитано, поскольку данные не соответствовали 4-параметрическому логистическому уравнению, не определено, поскольку не было обнаружено зависимое от концентрации увеличение высвобождения IL-2.

Таблица 30: Обобщенные данные по bs24963D-опосредуемому усилению пролиферации первичных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие REGN4018 с клетками-мишенями OVCAR-3 и PEO1

Линия клеток - мишеней	Донор	Антитело в фиксированной концентрации (5 нМ)	Антитело, протестированное в различных концентрациях (от 7,6 пМ до 500 нМ)	Пролиферация Т-клеток		
				ЭК ₅₀ (М)	Макс. пролиферация ^a (имп./мин)	Кратное увеличение ^b (пролиферация)
OVCAR-3	Донор 555014	REGN4018	bs24963D	8,89×10 ⁻¹¹	13968	2,03
			He-TAAxCD28	NC	11260	1,59
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	336	1,38
			He-TAAxCD28	NC	579	1,60
	Донор 555109	REGN4018	bs24963D	9,45×10 ⁻¹¹	14818	3,18
			He-TAAxCD28	4,61×10 ⁻⁸	8141	1,66
		He-TAAxCD3	bs24963D	ND	416	1,37
			He-TAAxCD28	ND	475	1,33
	Донор 555131	REGN4018	bs24963D	2,47×10 ⁻¹¹	13607	1,66
			He-TAAxCD28	NC	10154	1,16
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	622	1,82
			He-TAAxCD28	NC	562	1,68
PEO1	Донор 555014	REGN4018	bs24963D	1,73×10 ⁻¹⁰	9605	3,27
			He-TAAxCD28	NC	6953	2,26
		He-	bs24963D	NC	603	2,58

Линия клеток - мишеней	Донор	Антитело в фиксированной концентрации (5 нМ)	Антитело, протестированное в различных концентрациях (от 7,6 пМ до 500 нМ)	Пролиферация Т-клеток		
				ЭК ₅₀ (М)	Макс. пролиферация ^a (имп./мин)	Кратное увеличение ^b (пролиферация)
		TAAxCD3	He-TAAxCD28	NC	551	3,09
	Донор 555109	REGN4018	bs24963D	4,04×10 ⁻¹⁰	10304	8,42
			He-TAAxCD28	NC	4888	4,62
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	733	2,84
			He-TAAxCD28	NC	419	1,72
	Донор 555014	REGN4018	bs24963D	2,22×10 ⁻¹⁰	10335	3,69
			He-TAAxCD28	4,22×10 ⁻⁸	5631	2,06
		He-TAAxCD3	bs24963D	NC	835	4,44
			He-TAAxCD28	NC	523	2,29

^aМаксимальная пролиферация представляет собой самое высокое среднее значение имп./мин, зарегистрированное в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела.

^bКратное увеличение максимальной пролиферации Т-клеток, опосредуемой bs24963D в присутствии или в отсутствие REGN4018, рассчитывали относительно максимальной пролиферации, опосредуемой в отсутствие bs24963D или не-TAAxCD28 контроля.

Сокращения: NC, не рассчитано, поскольку данные не соответствовали 4-параметрическому логистическому уравнению; ND, не определено, поскольку не было обнаружено зависимое от концентрации увеличение пролиферации.

Способность bs24963D (REGN5668) усиливать высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека и их пролиферацию в присутствии или в отсутствие цемиплимаба с клетками-мишенями SW1990 и SW1990/hPD-L1

[00293] При инкубации с MUC16⁺ клетками рака поджелудочной железы человека SW1990 и SW1990/hPD-L1 bs24963D опосредовал зависимое от концентрации усиление высвобождения IL-2 из Т-клеток человека (**Фигура 14**) и их пролиферации (**Фигура 15**) в присутствии и в отсутствие цемиплимаба. Сверхэкспрессия PD-L1 человека в клетках SW1990 подавляла IL-2 и пролиферацию Т-клеток в присутствии bs24963D, но при добавлении цемиплимаба наблюдали умеренное увеличение. В высоких концентрациях несоединяющее контрольное биспецифичное антитело к CD28 опосредовало некоторое высвобождение IL-2 в присутствии клеток SW1990 и SW1990/hPD-L1. В отсутствие

bs24963D цемиплимаб не увеличивал высвобождение IL-2 или пролиферацию Т-клеток по сравнению с несоединяющим контрольным биспецифичным антителом к CD28.

Таблица 31: Обобщенные данные по bs24963D-опосредуемому усилению высвобождения IL-2 из первичных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие цемиплимаба с клетками-мишенями SW1990 и SW1990/hPD-L1

Линия клеток-мишеней	Донор	Антитело в фиксированной концентрации (20 нМ)	Антитело, протестированное в различных концентрациях (от 7,6 пМ до 500 нМ)	Высвобождение IL-2 из первичных Т-клеток человека		
				ЭК ₅₀ (М)	Макс. IL-2 ^a (RFU)	Кратное увеличение ^b (IL-2)
SW1990	Донор 555109	цемиплимаб	bs24963D	2,98×10 ⁻⁹	3773	3,31
			He-TAAxCD28	ND	1415	1,98
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	2,31×10 ⁻⁹	2922	4,83
			He-TAAxCD28	ND	944	1,31
	Донор 555129	цемиплимаб	bs24963D	8,60×10 ⁻¹⁰	4833	3,39
			He-TAAxCD28	NC	2927	2,28
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	1,21×10 ⁻⁹	3589	2,89
			He-TAAxCD28	NC	2027	1,51
SW1990/hPD-L1	Донор 555109	цемиплимаб	bs24963D	1,01×10 ⁻⁹	1692	2,73
			He-TAAxCD28	NC	1102	1,60
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	2,55×10 ⁻⁹	1053	1,70
			He-TAAxCD28	ND	616	1,23
	Донор 555129	цемиплимаб	bs24963D	1,41×10 ⁻⁹	3391	2,33
			He-TAAxCD28	NC	1977	1,57
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	2,22×10 ⁻⁹	2161	2,14
			He-TAAxCD28	ND	1459	1,49

^aМаксимальная концентрация IL-2 представляет собой самое высокое среднее значение концентрации IL-2, зарегистрированное в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела.

^bКратное увеличение максимального высвобождения IL-2, опосредуемого bs24963D в присутствии или в отсутствие цемиплимаба, рассчитывали относительно максимального высвобождения IL-2, опосредуемого отсутствием антитела.

Сокращения: NC, не рассчитано, поскольку данные не соответствовали 4-параметрическому логистическому уравнению; ND, не определено, поскольку не было обнаружено зависимое от концентрации увеличение высвобождения IL-2.

Таблица 32: Обобщенные данные по bs24963D-опосредуемому усилению пролиферации первичных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие цемиплимаба с клетками-мишенями SW1990 и SW1990/hPD-L1

Линия клеток-мишеней	Донор	Антитело в фиксированной концентрации (20 нМ)	Антитело, протестированное в различных концентрациях (от 7,6 пМ до 500 нМ)	Пролиферация Т-клеток		
				ЭК ₅₀ (М)	Макс. пролиферация ^a (имп./мин)	Кратное увеличение ^b (пролиферация)
SW1990	Донор 55510 ₉	цемиплимаб	bs24963D	$1,68 \times 10^{-9}$	557	4,52
			He-TAAxCD28	ND	161	1,41
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	$2,86 \times 10^{-9}$	421	4,36
			He-TAAxCD28	ND	123	1,46
	Донор 55512 ₉	цемиплимаб	bs24963D	$4,59 \times 10^{-10}$	545	2,47
			He-TAAxCD28	ND	279	1,66
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	$4,83 \times 10^{-10}$	569	2,17
			He-TAAxCD28	ND	353	1,46
SW1990/hPD-L1	Донор 55510 ₉	цемиплимаб	bs24963D	$1,40 \times 10^{-9}$	279	4,70
			He-TAAxCD28	ND	151	1,98
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	$1,54 \times 10^{-9}$	140	2,35
			He-TAAxCD28	ND	84,0	1,42

	Донор 55512 9	цемиплимаб	bs24963D	$2,53 \times 10^{-9}$	601	3,20
			He-TAAxCD28	NC	222	1,73
		Контроль IgG4 ^P	bs24963D	$1,66 \times 10^{-9}$	333	2,74
			He-TAAxCD28	ND	146	1,62

^aМаксимальная пролиферация представляет собой самое высокое среднее значение имп./мин, зарегистрированное в пределах тестируемого диапазона концентраций антитела.

^bКратное увеличение максимальной пролиферации Т-клеток, опосредуемой bs24963D в присутствии или в отсутствие цемиплимаба, рассчитывали относительно максимальной пролиферации, опосредуемой в отсутствие bs24963D или не-TAAxCD28 контроля.

Сокращения: NC, не рассчитано, поскольку данные не соответствовали 4-параметрическому логистическому уравнению; ND, не определено, поскольку не было обнаружено зависимое от концентрации увеличение пролиферации.

[00294] Настоящее изобретение не ограничивается в объеме конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых графических материалов. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен (D1), который связывает CD28 человека с K_D менее чем приблизительно 2×10^{-7} М при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; и

б) второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфично связывает мембранный антиген муцин 16 (MUC16) человека на опухолевой клетке-мишени с K_D менее чем приблизительно 10^{-9} М при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

2. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью Т-клеток человека с $ЭК_{50}$ менее чем приблизительно 10^{-5} М при измерении с помощью анализа связывания методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) *in vitro*.

3. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью Т-клеток яванской макаки с $ЭК_{50}$ менее чем приблизительно 6×10^{-6} М при измерении с помощью анализа связывания методом FACS *in vitro*.

4. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с поверхностью линий клеток, экспрессирующих MUC16, с $ЭК_{50}$ менее чем приблизительно 10^{-9} М при измерении с помощью анализа связывания методом FACS *in vitro*.

5. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 1, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула демонстрирует костимулирующее действие при применении в сочетании с биспецифичным антителом к MUC16xCD3 и тестировании на клетках-мишенях, экспрессирующих MUC16.

6. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 5, где указанное костимулирующее действие проявляется в одном или более из следующего: (а) способности активировать и направлять Т-клетки человека на уничтожение клетки-мишени, экспрессирующей MUC16; (б) способности положительно регулировать PD-1 на Т-клетках; (с) способности увеличивать высвобождение цитокинов IFN-гамма из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК); (d) способности истощать опухолевые клетки; или (f) способности усиливать устранение опухоли, и/или (g) отсутствии индукции системной активации Т-клеток.

7. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п. 6, где указанное костимулирующее действие дополнительно показано (g) с помощью измерения выработки цитокина IL-2 с использованием функционального анализа первичных $CD4^+$ Т-клеток/антигенпрезентирующих клеток (АПК).

8. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-7, где указанная опухолевая клетка-мишень представляет собой клетку рака яичников.

9. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-8, где указанный первый антигенсвязывающий домен (D1) содержит:

а) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 42; и

б) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

10. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.9, содержащая:

а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 44, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 46, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 48.

11. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.10, содержащая:

а) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

12. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.9, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), причем указанный набор содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24 и 44, 46, 48, и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), причем указанный набор содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14, 16 и 36, 38, 40.

13. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.9, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/10; и 42/34.

14. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-13, где указанный второй антигенсвязывающий домен содержит:

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

б) три LCDR, содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

15. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.14, где указанный второй антигенсвязывающий домен содержит:

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

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

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

16. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.15, где указанный второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

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

а) набор CDR HCVR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), причем указанный набор содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 6, 8; и 28, 30, 32, и набор CDR LCVR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), причем указанный набор содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14, 16; и 36, 38, 40.

18. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-17, содержащая:

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

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

19. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-17, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46, 48, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36, 38, 40; и

б) второй антигенсвязывающий домен, содержащий HCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30, 32, и LCDR, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36, 38, 40.

20. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-17, содержащая:

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

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

21. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-17, где

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

б) указанный второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26/34.

22. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с MUC16 или связывается с тем же эпитопом на MUC16, что и референсное антитело, причем указанное референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18/10 или 42/34, и второй антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/10 или 26/34.

23. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с CD28 человека или связывается с тем же эпитопом на CD28 человека, что и референсное антитело, причем указанное референсное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18/10 или 42/34, и второй антигенсвязывающий домен, имеющий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/10 и 26/34.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-23 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

25. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифичное антитело по любому из пп.1-23.

26. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.25.

27. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.26.

28. Способ ингибирования роста опухоли из клеток яичника у субъекта, включающий введение указанному субъекту выделенного биспецифичного антитела по любому из пп.1-23 или фармацевтической композиции по п.26.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

30. Способ по п.29, где указанный второй терапевтический агент включает противоопухолевый агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

31. Способ лечения пациента, страдающего раком яичников или другим злокачественным новообразованием из клеток, экспрессирующих MUC16, включающий введение указанному субъекту выделенного биспецифичного антитела по любому из пп.1-23 или фармацевтической композиции по п.24.

32. Способ по п.31, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

33. Способ по п.32, где указанный второй терапевтический агент включает противоопухолевый агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифичное антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки или их комбинации.

34. Способ по любому из пп.29 или 32, где указанный второй терапевтический агент представляет собой другое биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывается с тем же опухолевым антигеном-мишенью, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 на Т-клетках.

35. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-23, где указанная антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредуемую Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток яичника человека.

36. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD28 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC16 человека.

37. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.36, где указанная антигенсвязывающая молекула связывается с CD28-экспрессирующими Т-клетками человека со значением $ЭК_{50}$ от 1×10^{-12} М до 10×10^{-6} М.

38. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.37, где указанная антигенсвязывающая молекула связывается с CD28-экспрессирующими Т-клетками человека со значением $ЭК_{50}$ от 1×10^{-9} М до 10×10^{-6} М.

39. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-38, где указанная антигенсвязывающая молекула связывает клетки человека, экспрессирующие CD28 человека, и клетки яванской макаки, экспрессирующие CD28 яванской макаки.

40. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-38, где указанная антигенсвязывающая молекула индуцирует высвобождение цитокинов и положительную регуляцию CD25 в цельной крови человека.

41. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-38, где указанная антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредуемую Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток яичника человека.

42. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-41, где указанный первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 42, и

определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

43. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий MUC16 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 2 и 26, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

44. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 44; при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 46; при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 48, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

45. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий MUC16 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 28; при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 30; при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 32, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

46. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающий CD28 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2

и LCDR3), и указанный второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающий MUC16 человека, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3); при этом указанный первый антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 44; при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 46; при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 48, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40; и при этом указанный второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 28, при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 30, при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 32, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

47. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 44; при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 46; при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 48, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

48. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариabельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 42, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

49. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 28; при этом HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 30; при этом HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 32, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 36, при этом LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 38, и при этом LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 40.

50. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 26, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

51. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.36-42, где указанный первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 42, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34, и указанный второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с референсным антигенсвязывающим белком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 26, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 34.

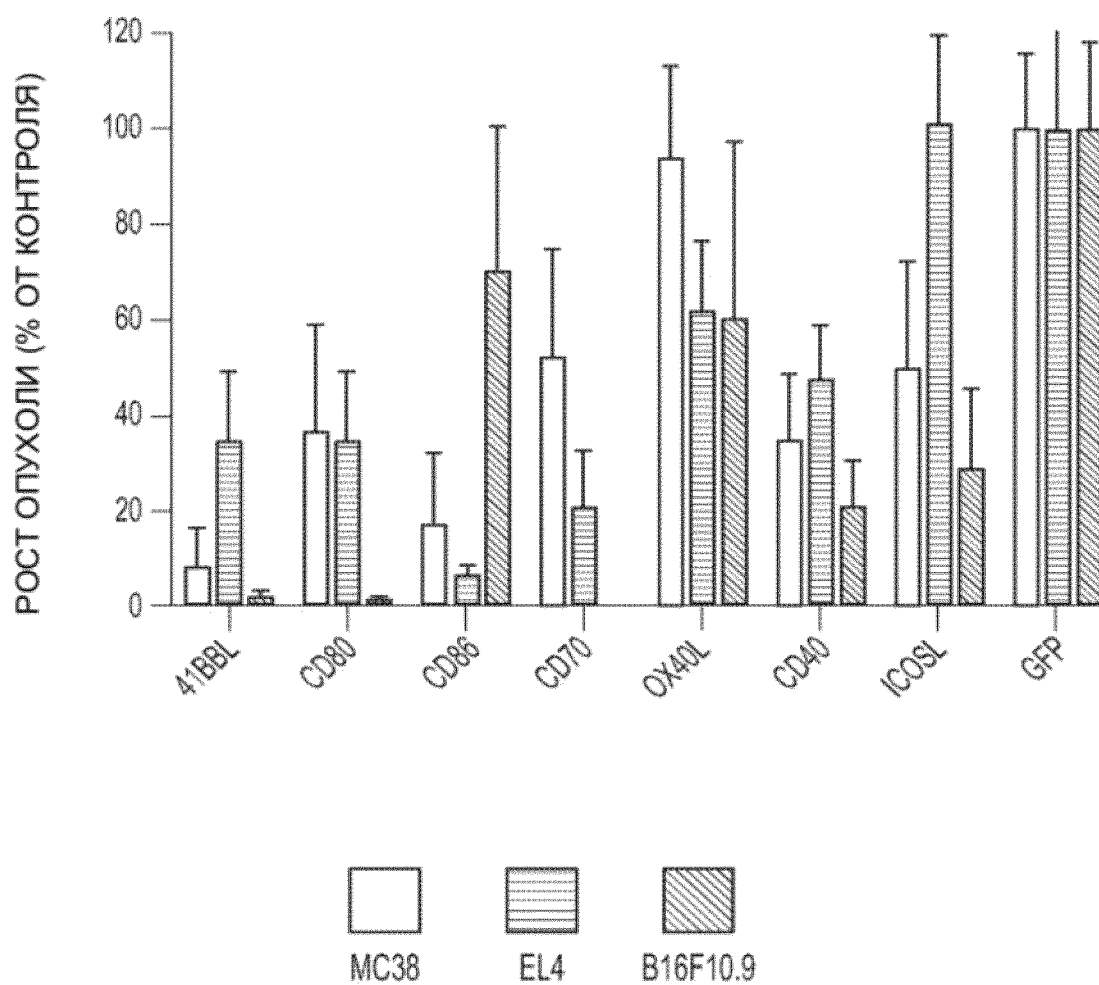
52. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.36-51 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

53. Способ лечения рака яичников у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п.52.

54. Способ по любому из пп.28-34 и 53, где указанную биспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят в фиксированной дозе.

По доверенности

1/24

**ФИГ. 1**

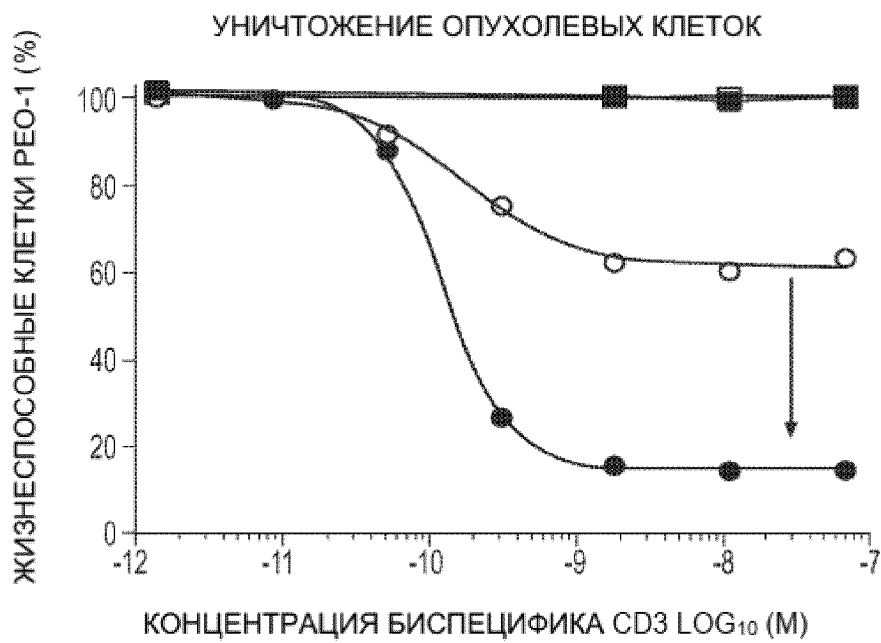
КЛЕТКИ-МИШЕНИ: ЛИНИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ РЕО-1
(ЭНДОГЕННЫЙ MUC16+)



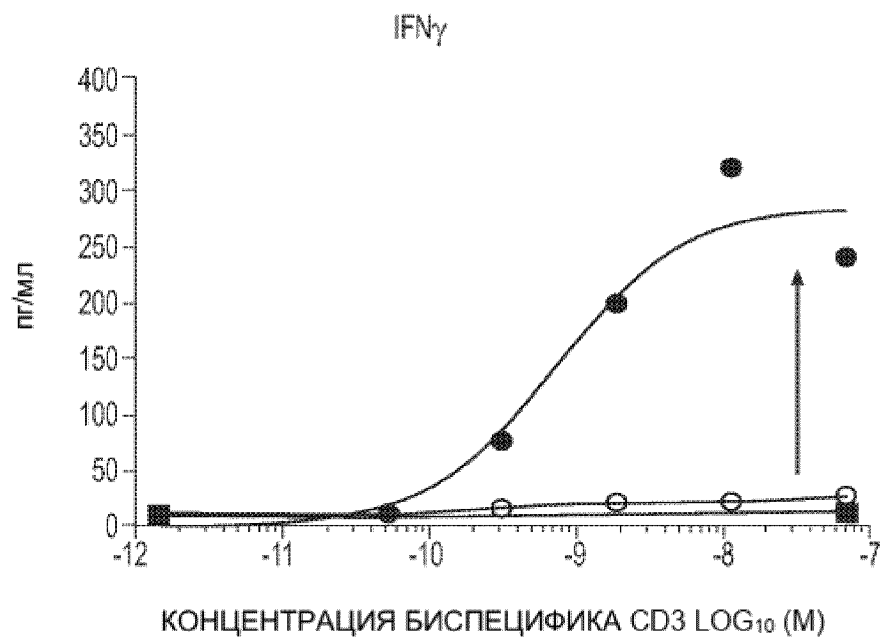
- MUC16xCD3 + MUC16xCD28
- MUC16xCD3
- БЕЗ НАЦЕЛИВАНИЯxCD3 + MUC16xCD28
- БЕЗ НАЦЕЛИВАНИЯxCD3

ФИГ. 2А

3/24

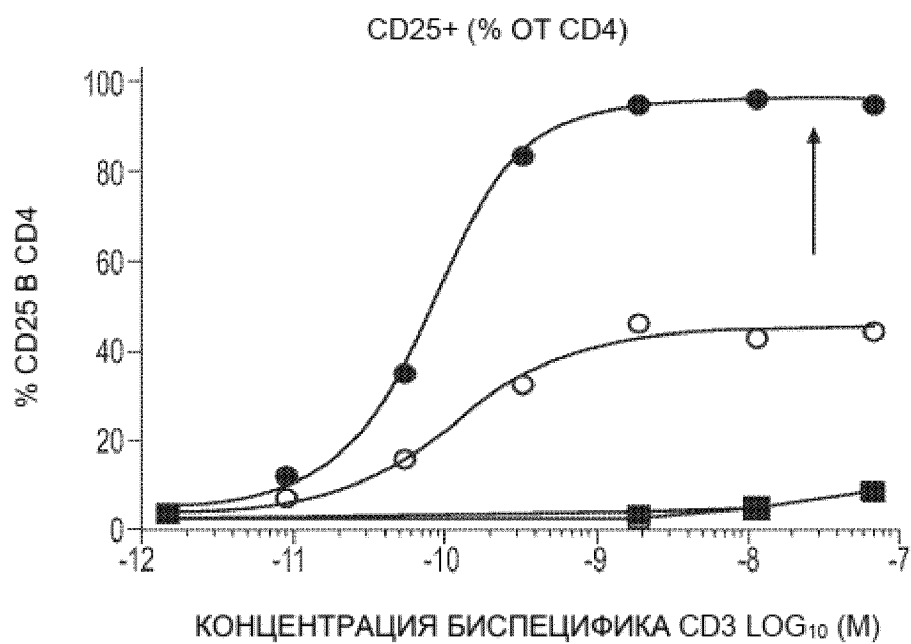
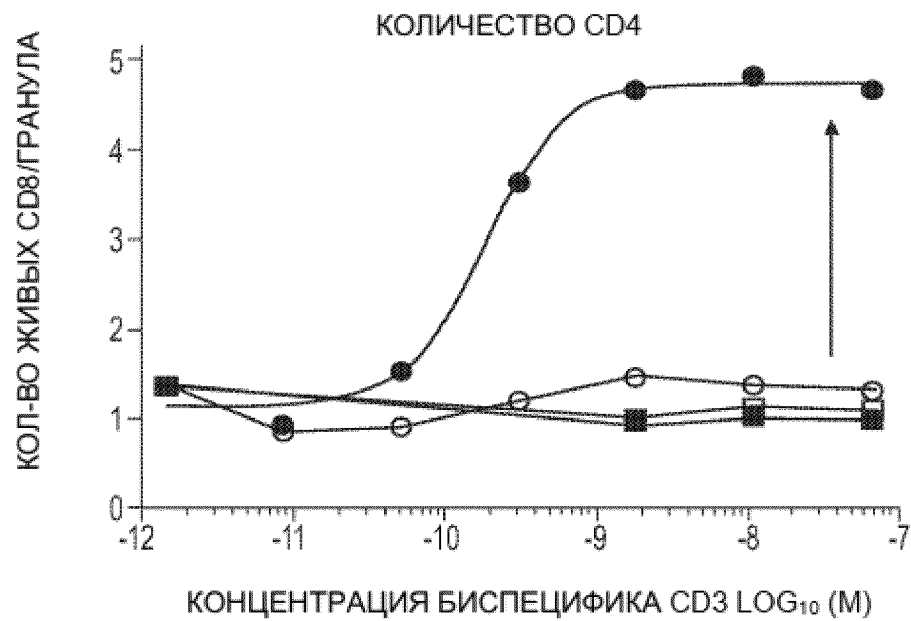


ФИГ. 2В

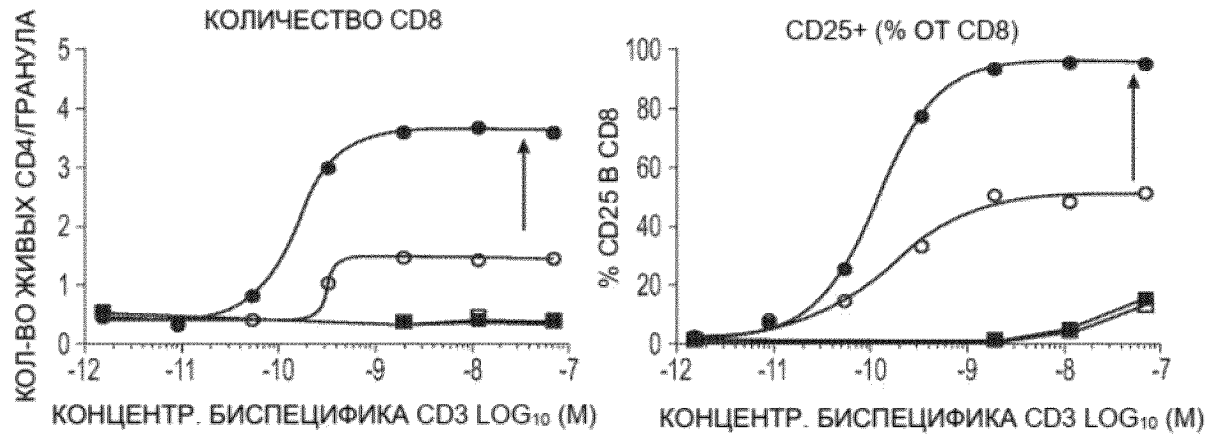


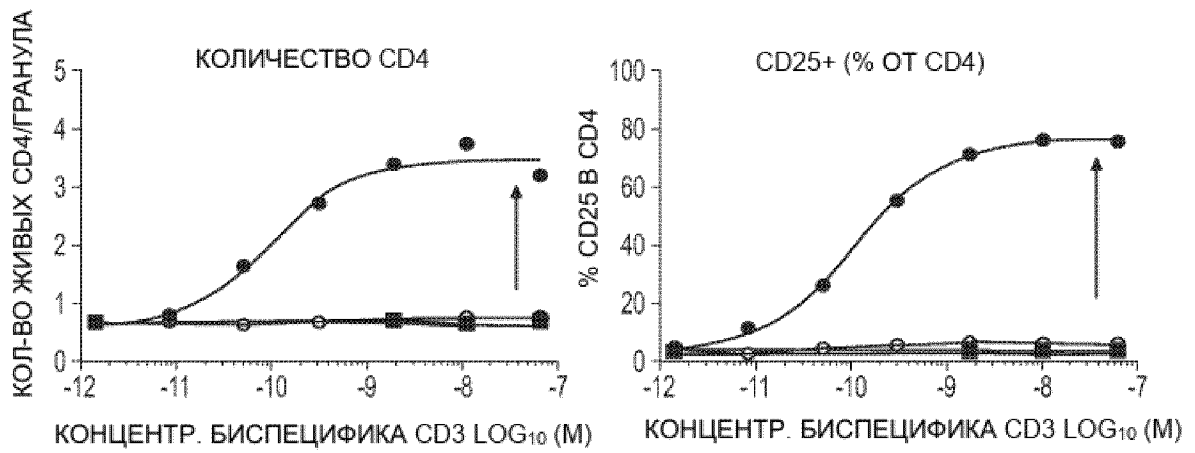
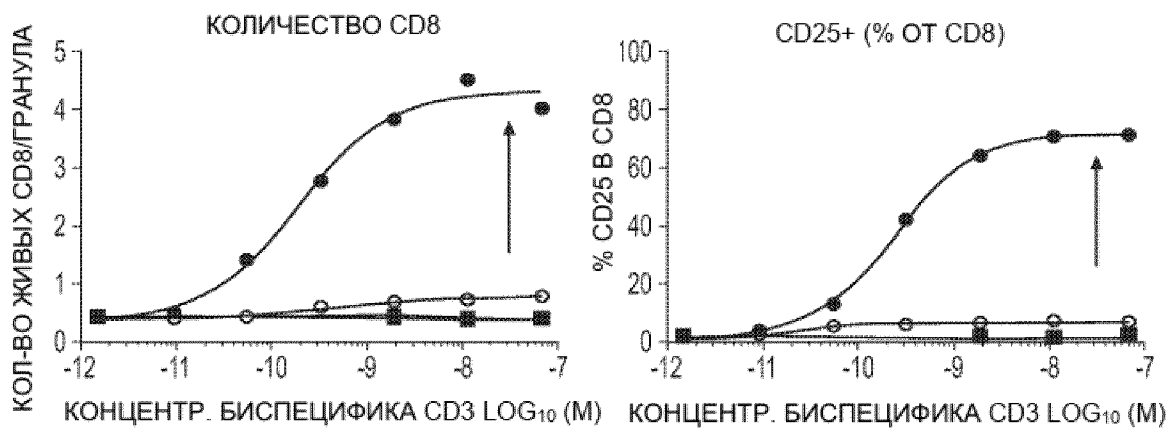
ФИГ. 2С

4/24

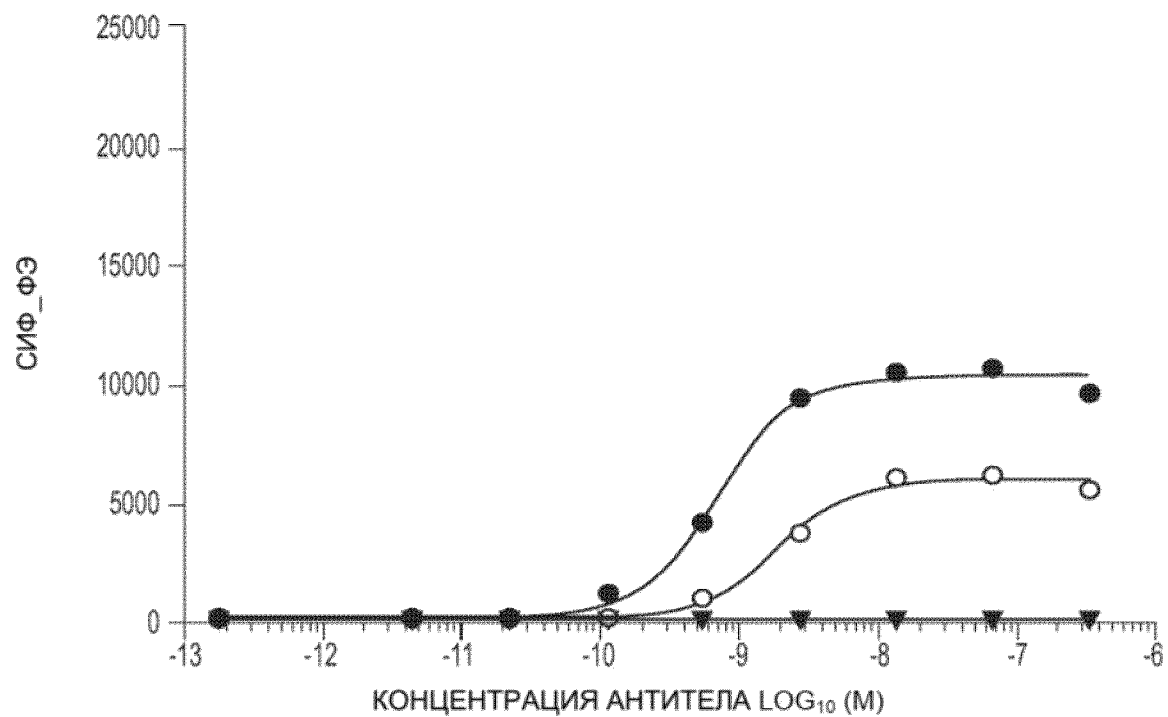


ФИГ. 2D

**ФИГ. 2Е****ФИГ. 2F**

**ФИГ. 2G****ФИГ. 2H**

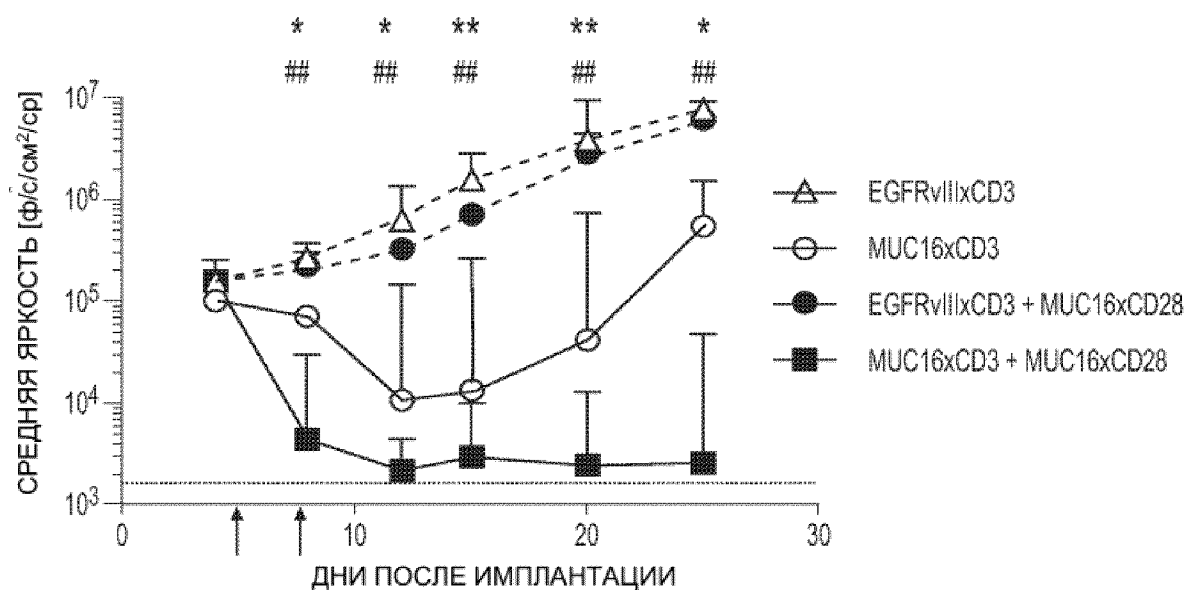
FACS-анализ связывания



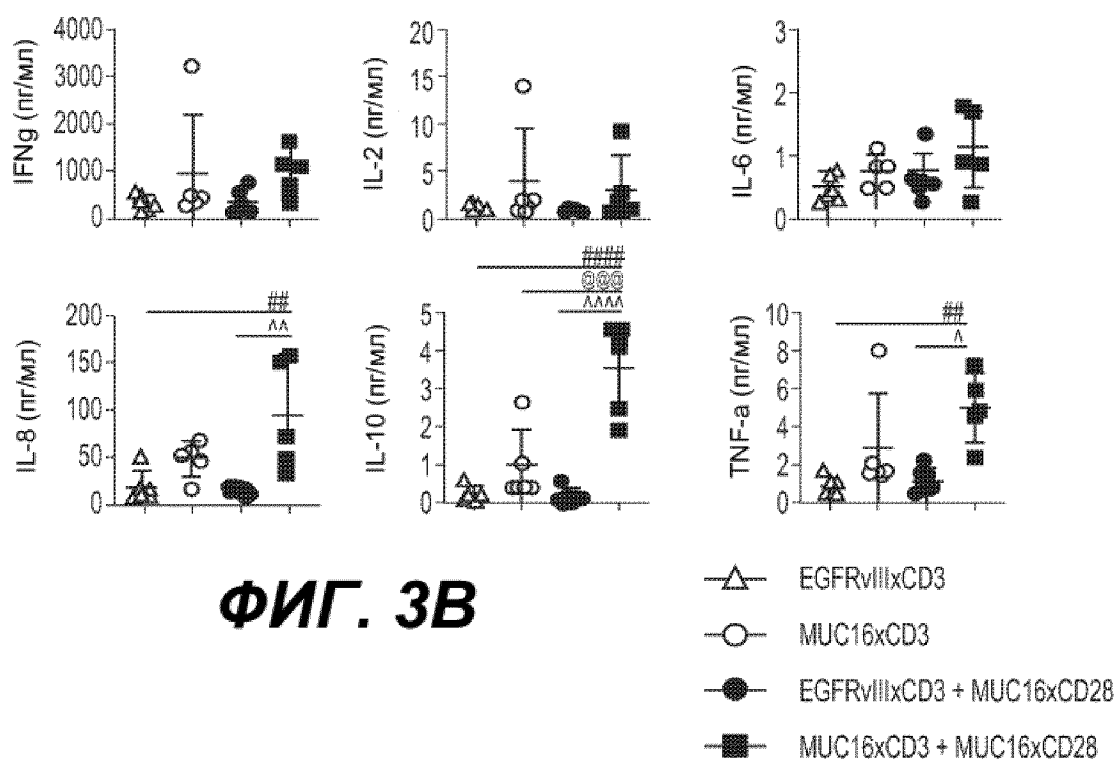
- MUC16xCD28
- MUC16xCD3
- ▼ CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ

	ЭК50
MUC16xCD28	6,789E-010
MUC16xCD3	1,843E-009
CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ	~2,274E-009

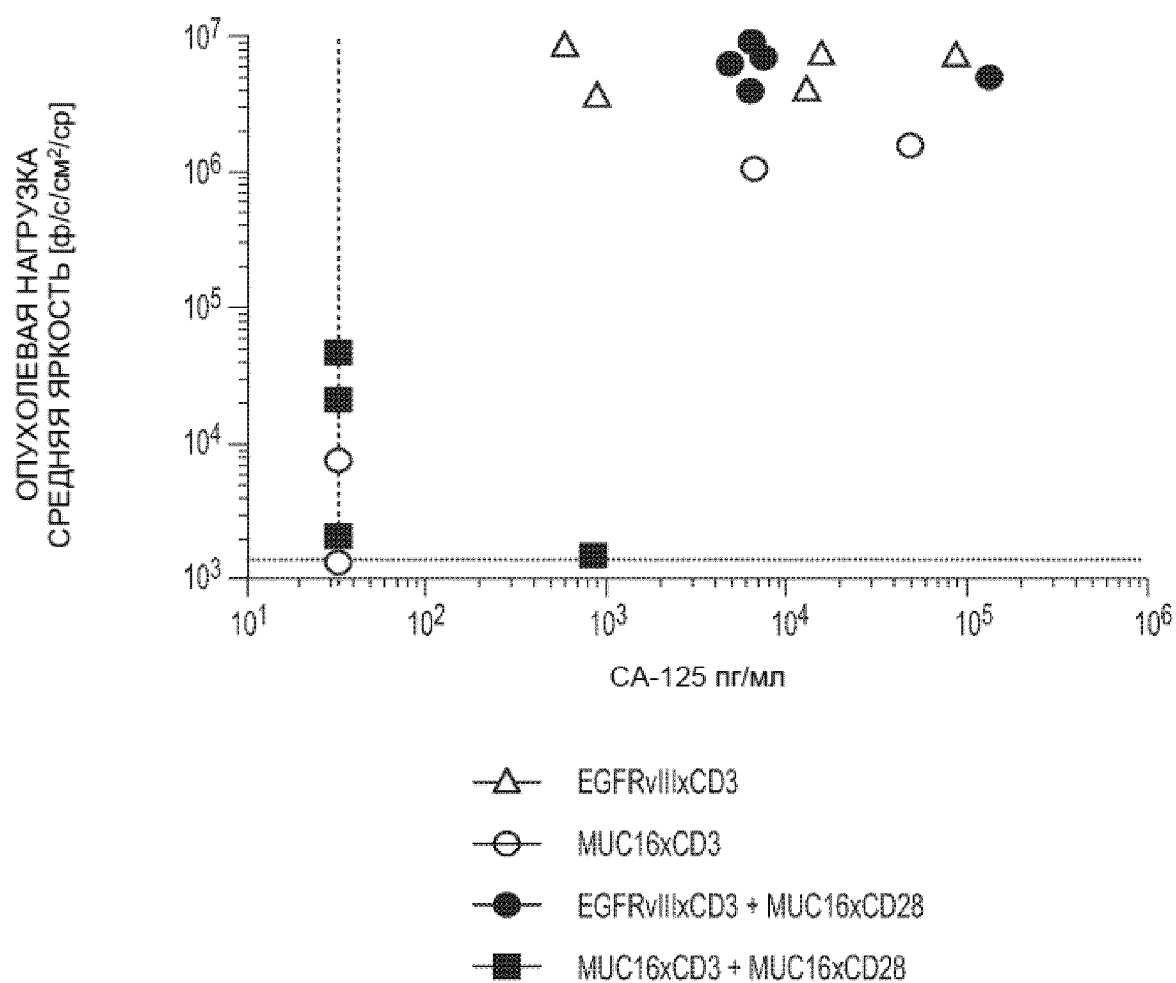
ФИГ. 21



ФИГ. 3А

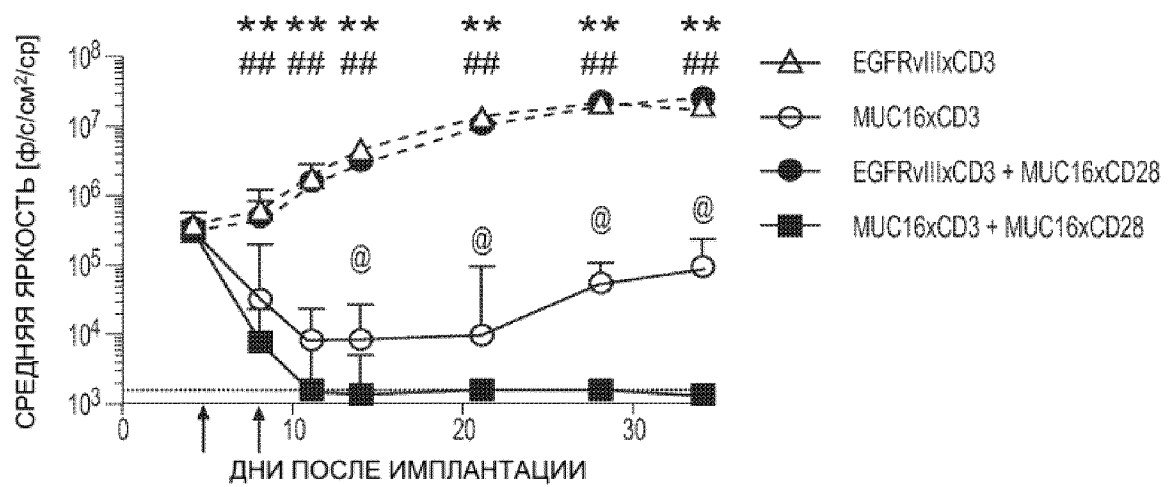


9/24

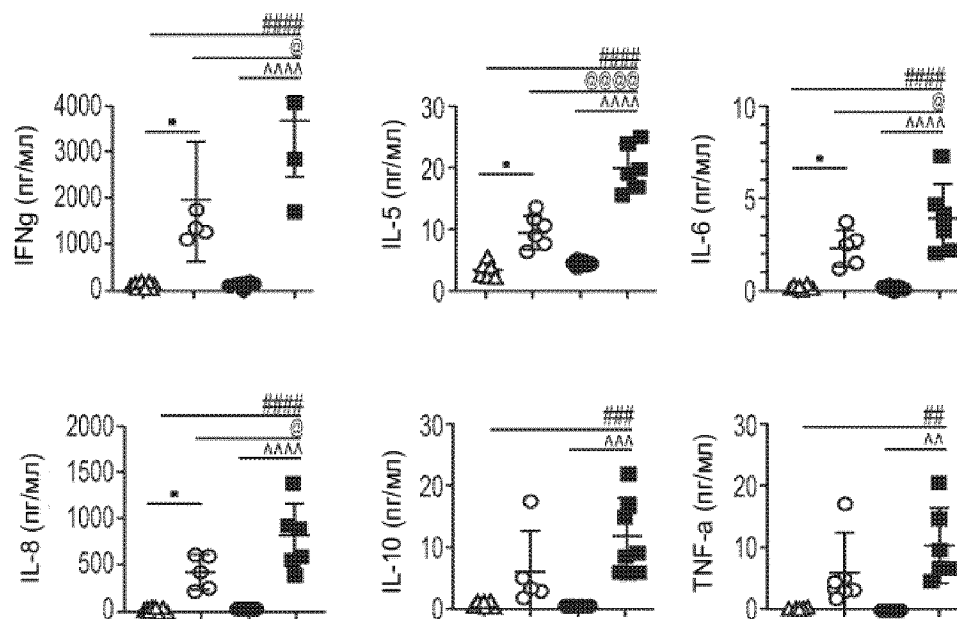


ФИГ. 3С

10/24

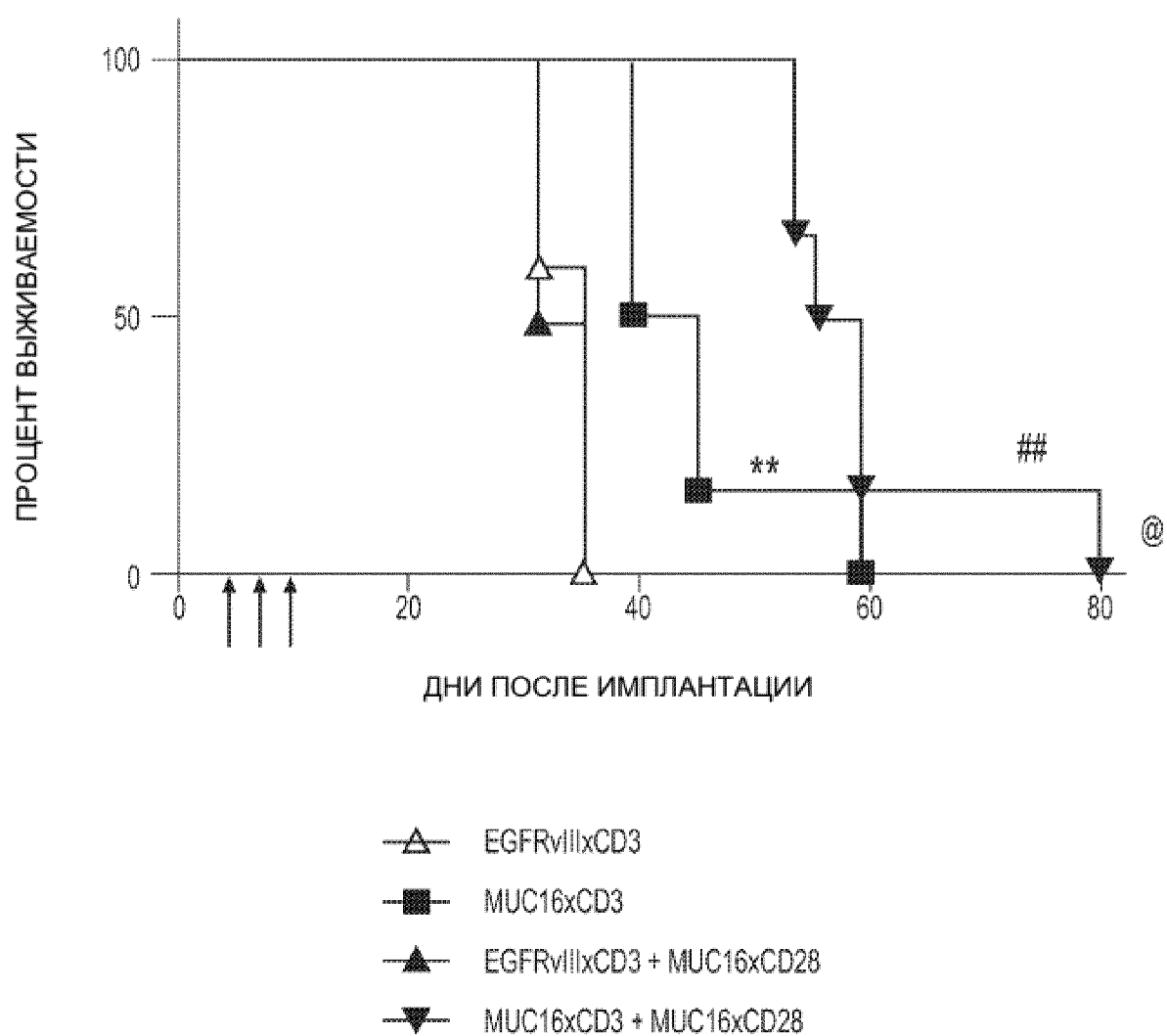


ФИГ. 4А

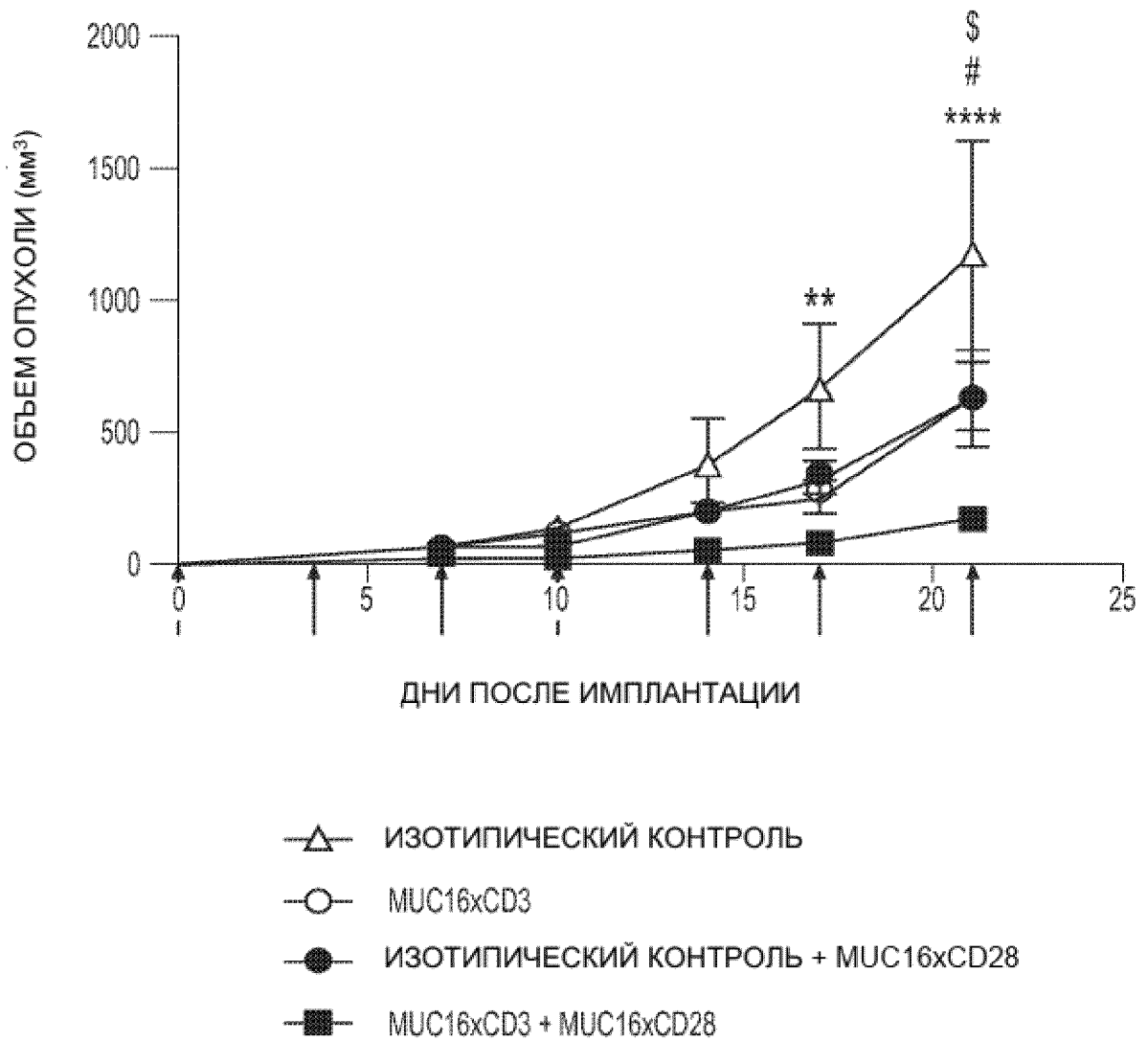


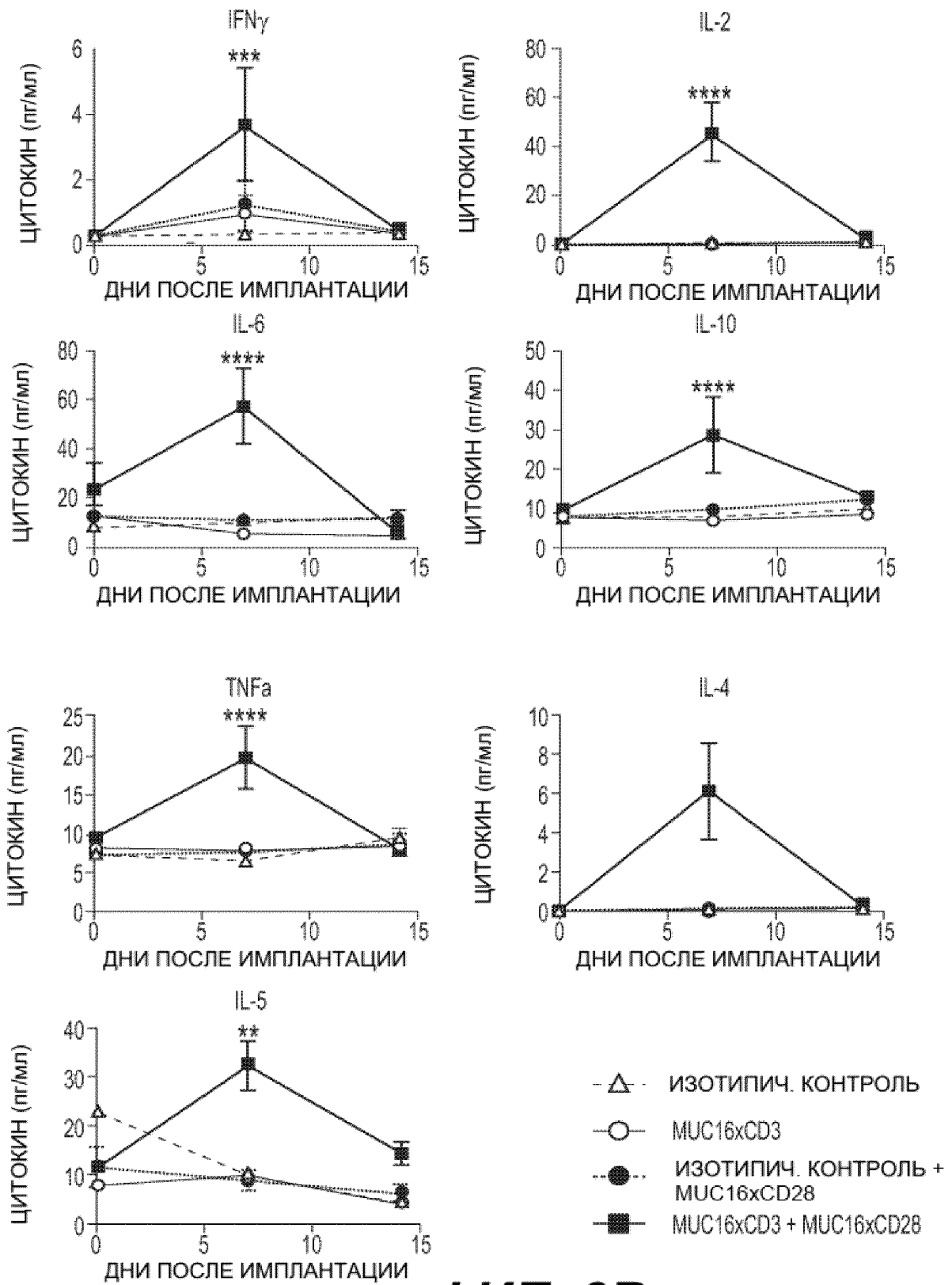
ФИГ. 4В

11/24

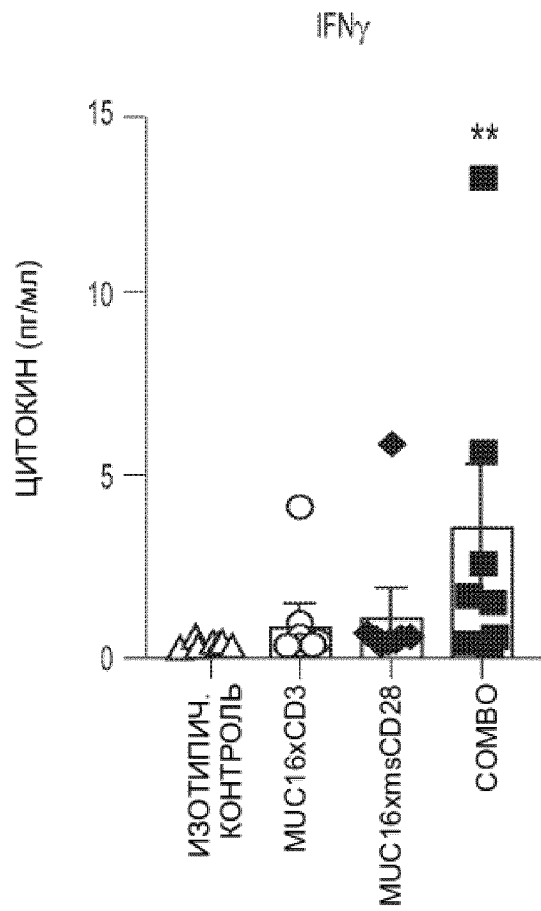
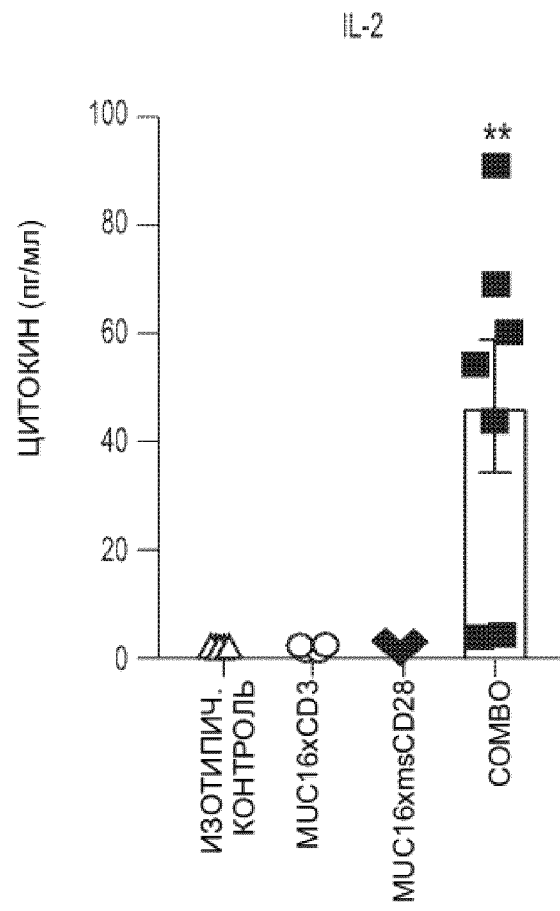


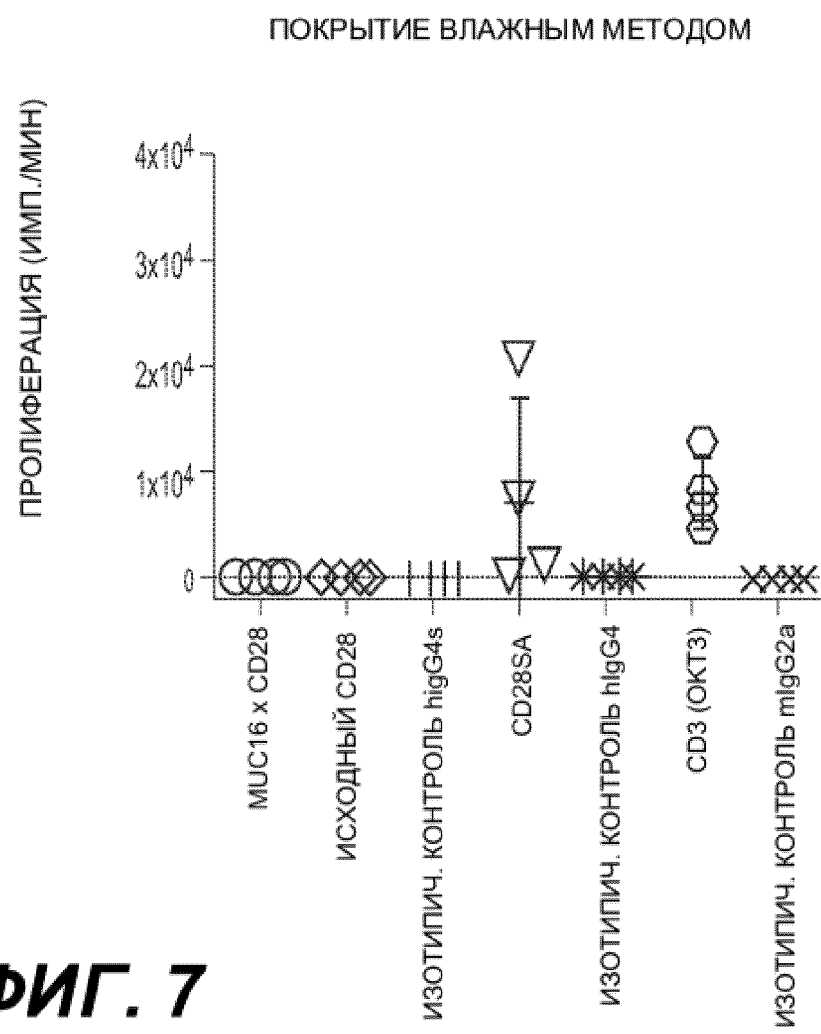
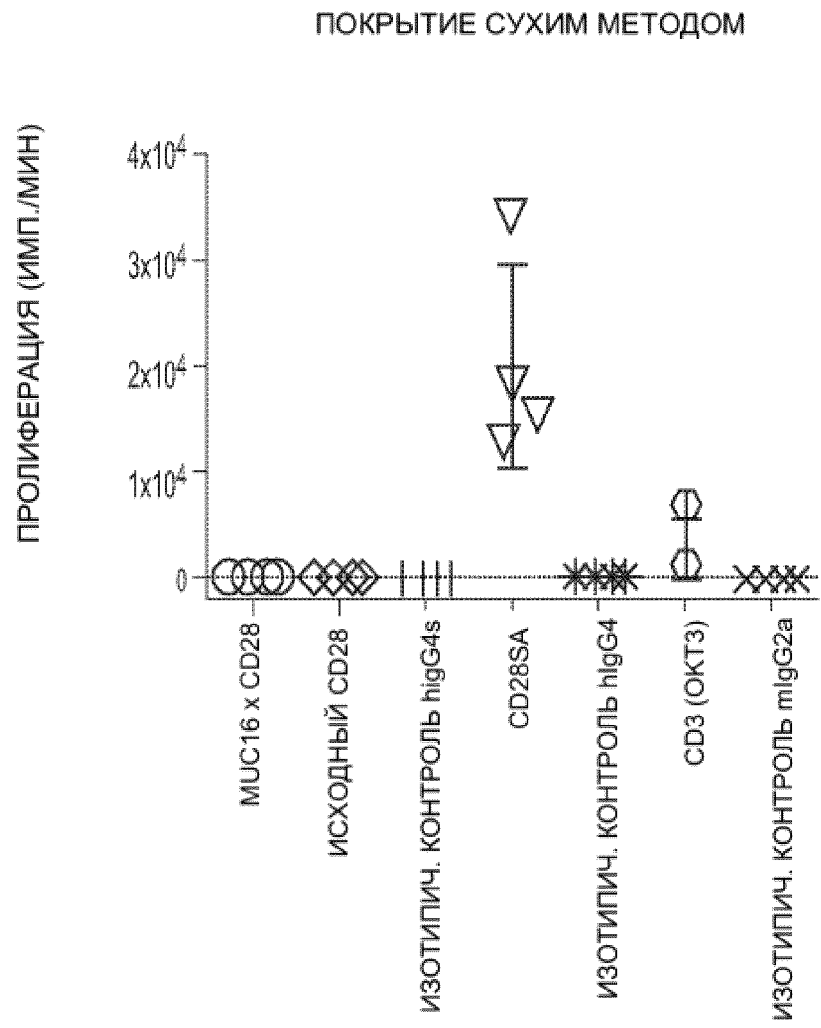
ФИГ. 5

**ФИГ. 6А**

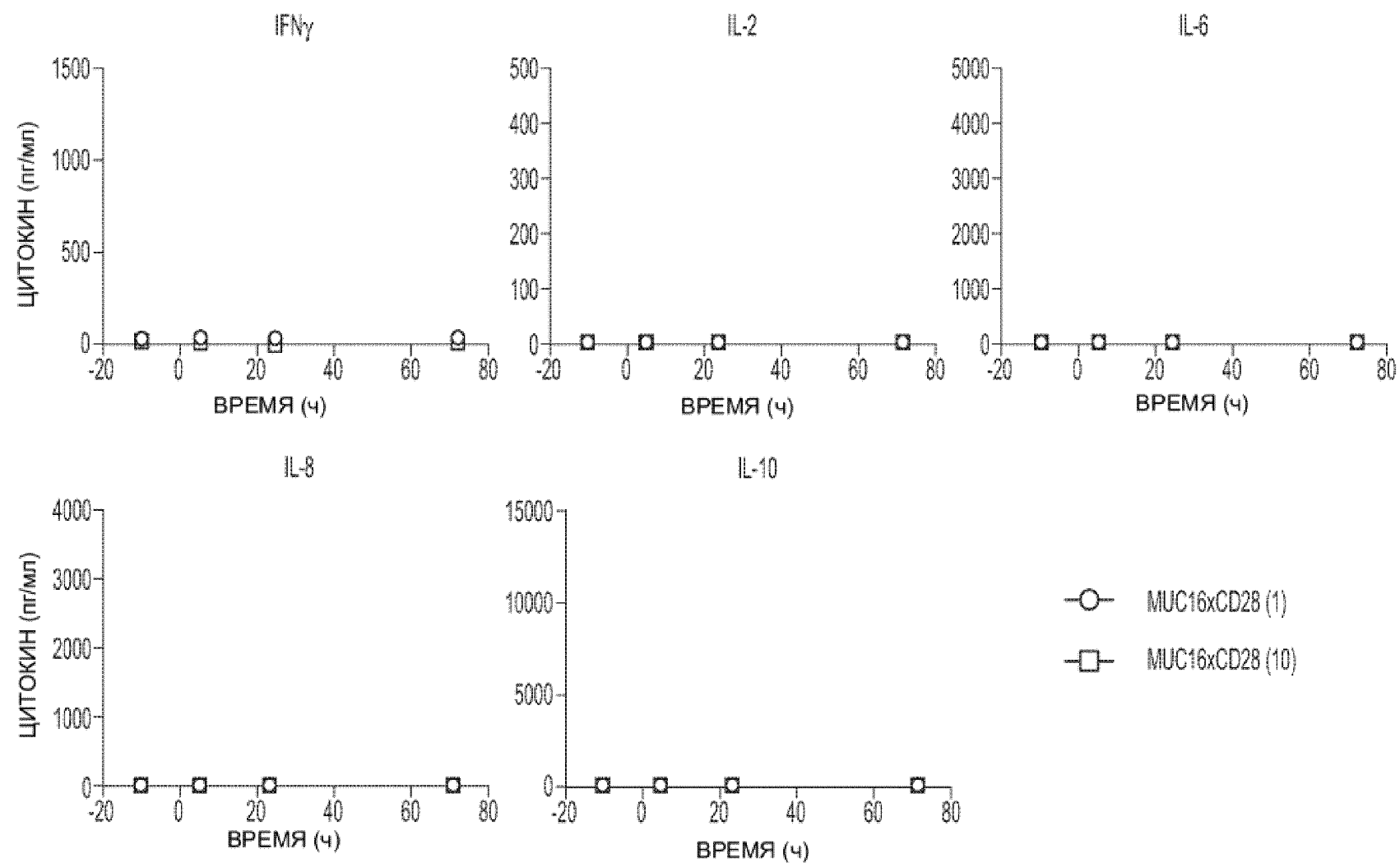


ФИГ. 6В

**ФИГ. 6С****ФИГ. 6D**

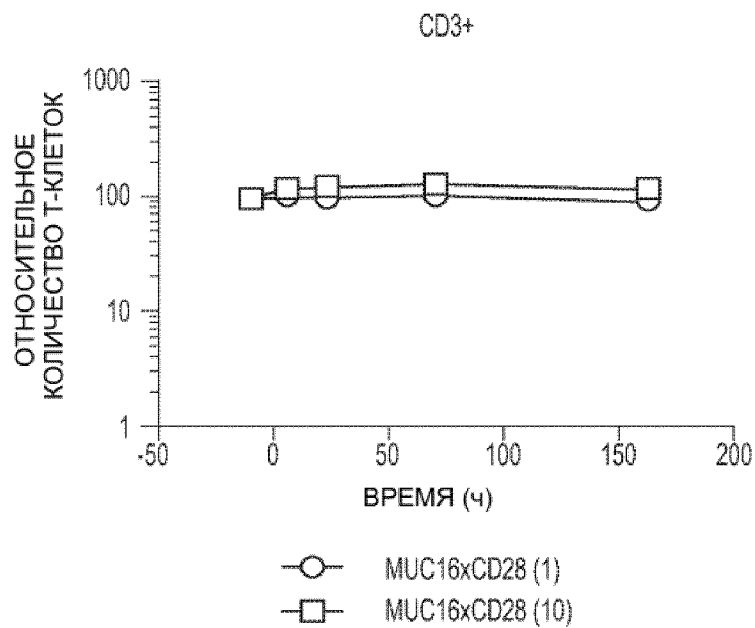


ФИГ. 7

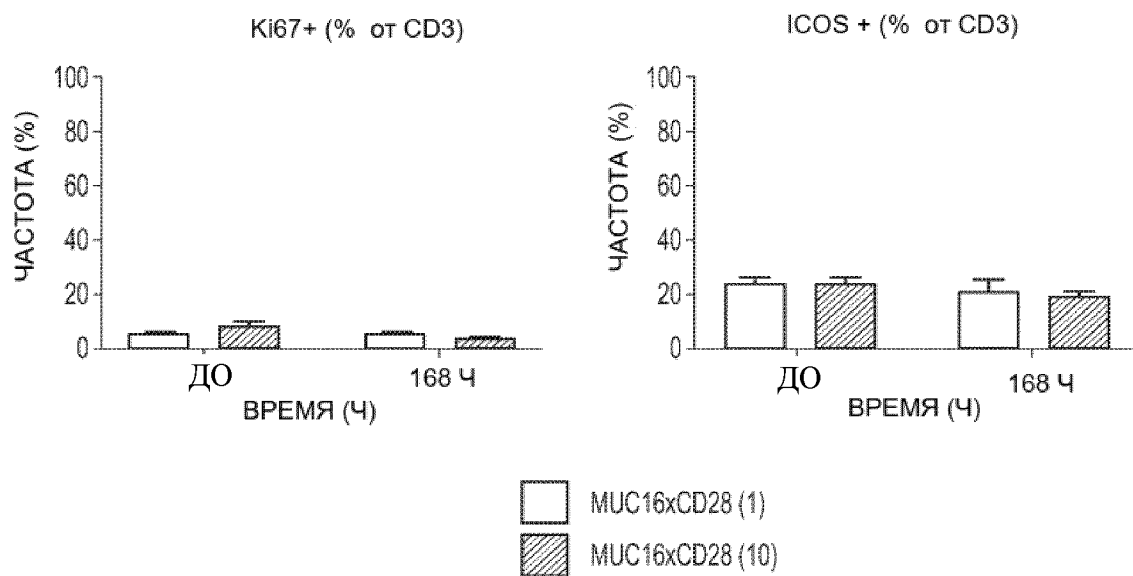


ФИГ. 8А

17/24

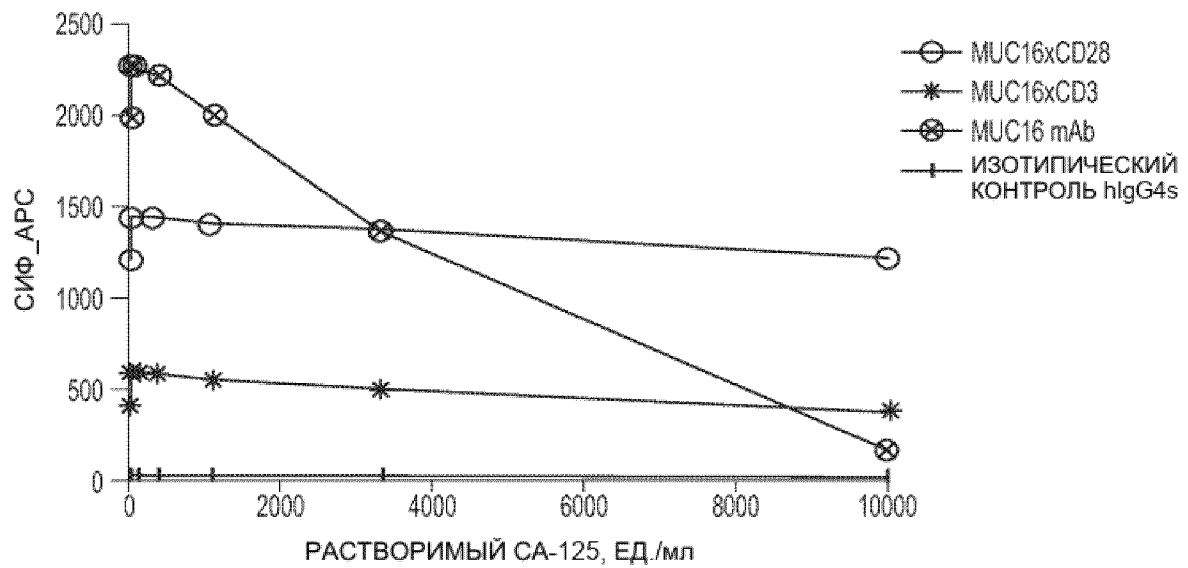


ФИГ. 8В

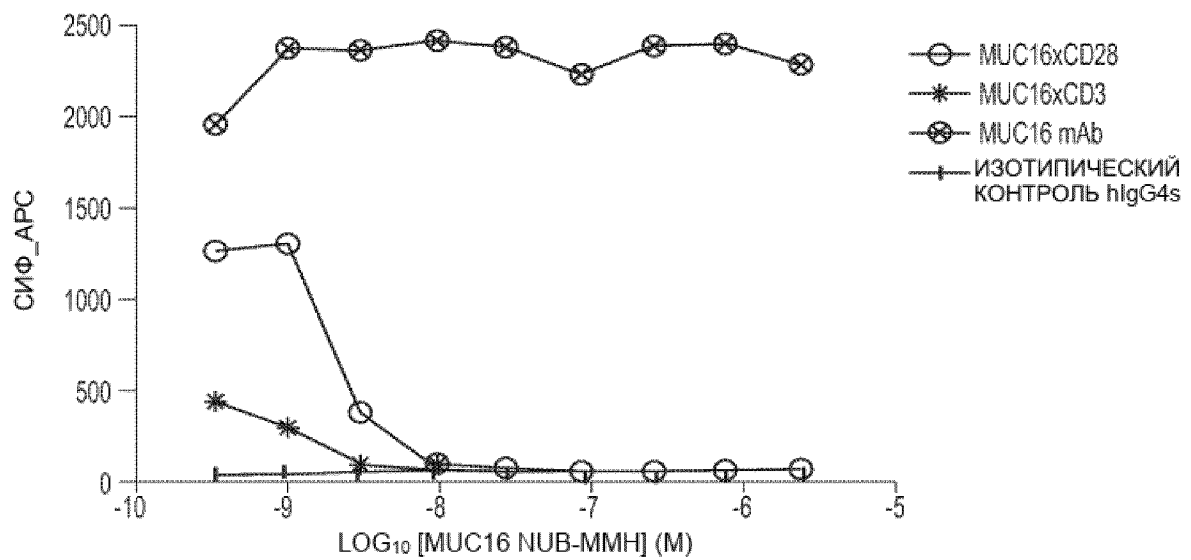


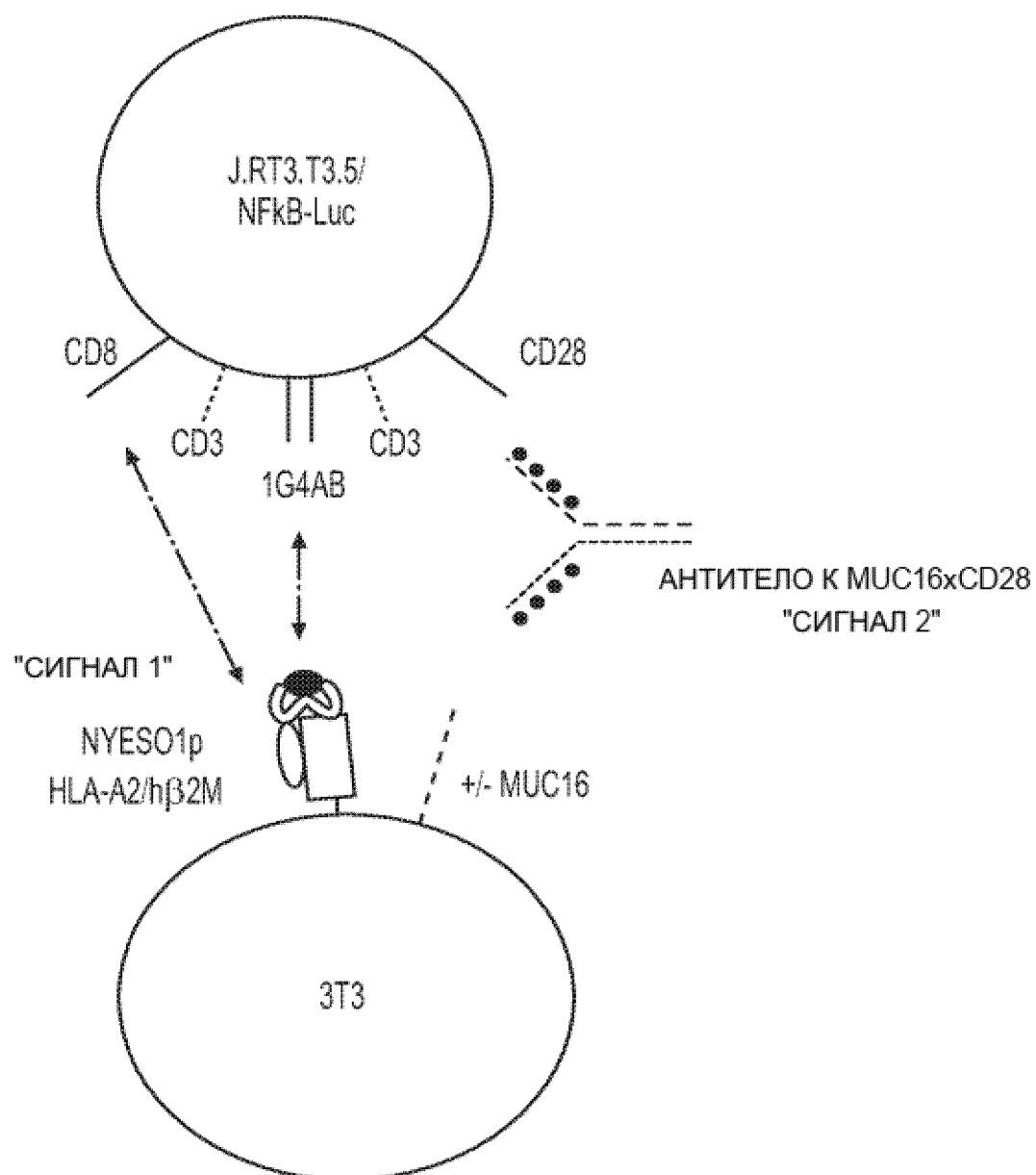
ФИГ. 8С

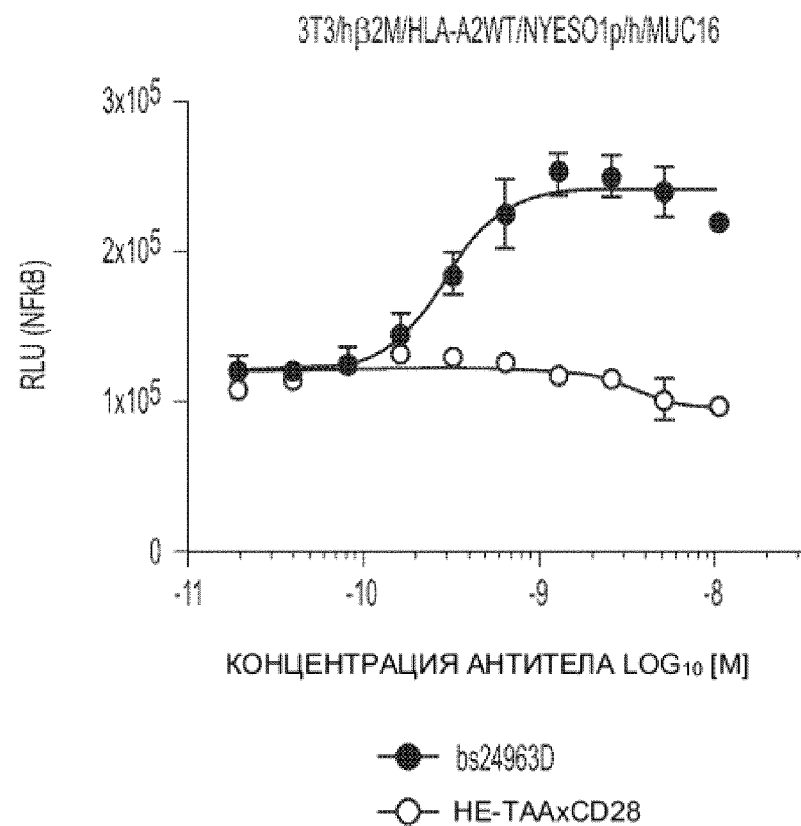
БЛОК СА-125

**ФИГ. 9А**

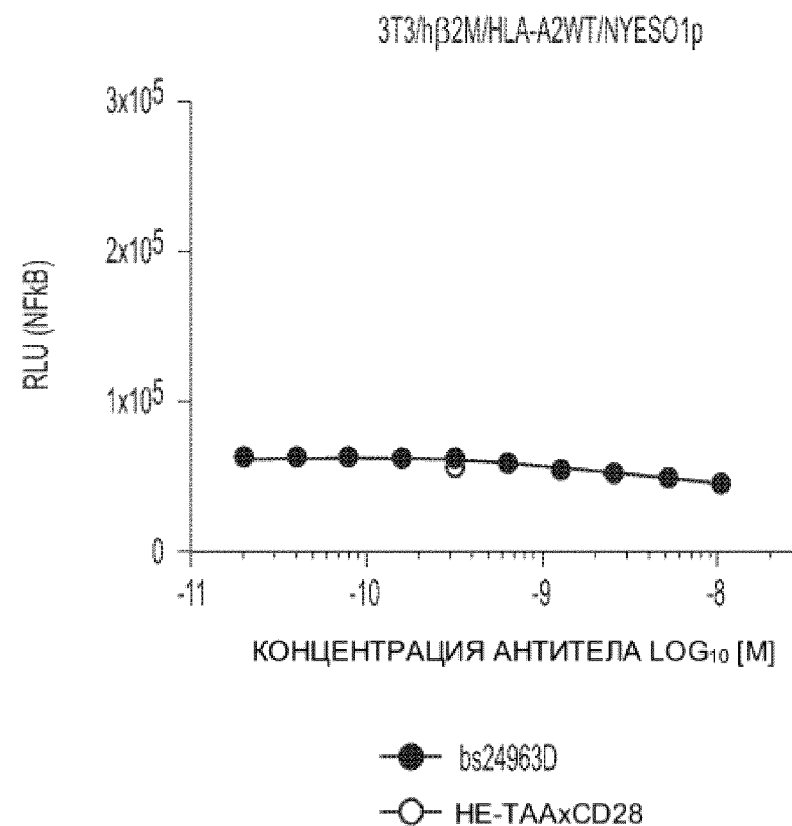
БЛОК MUC16 NUB

**ФИГ. 9В**

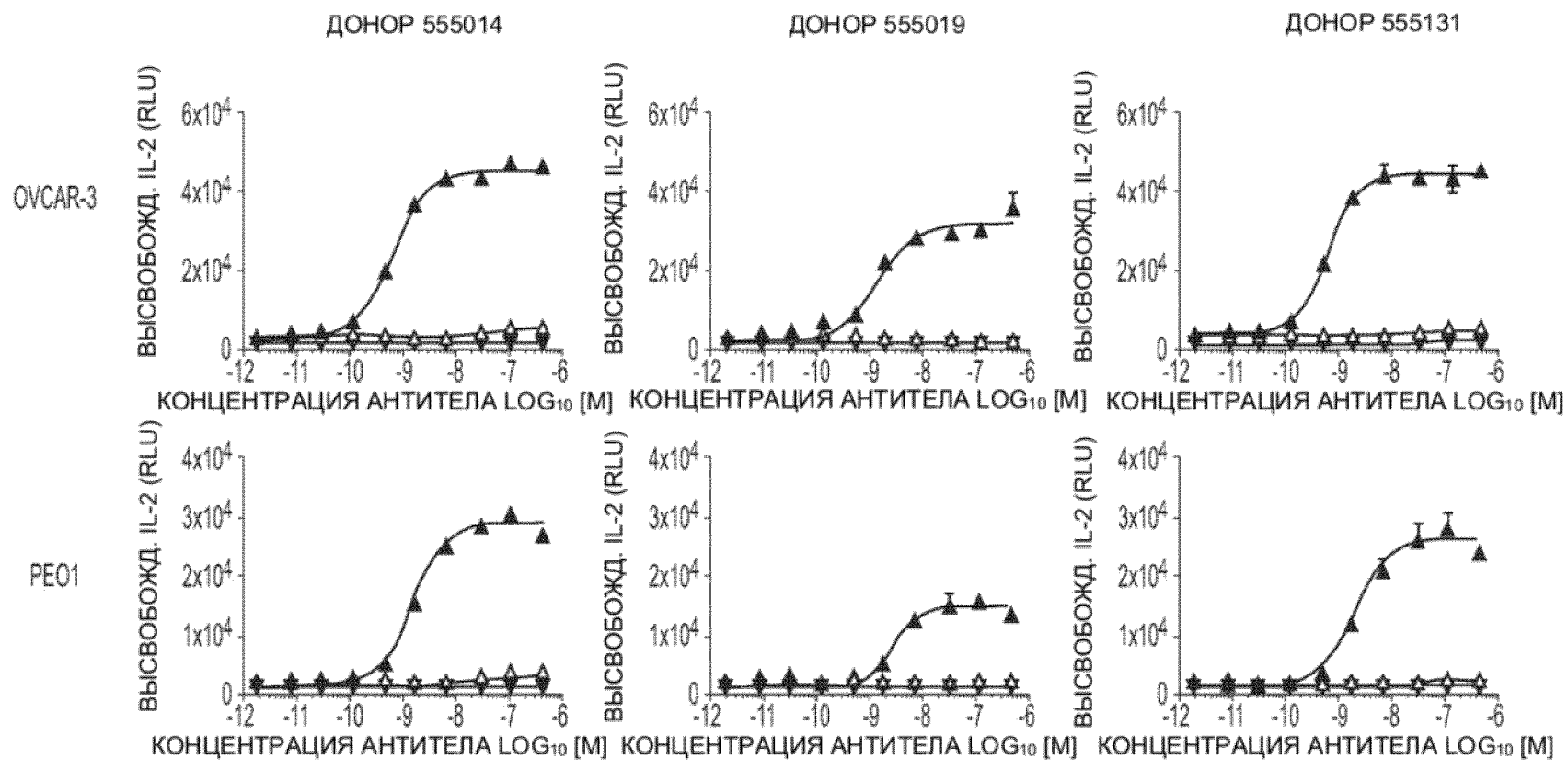
**ФИГ. 10**



ФИГ. 11А

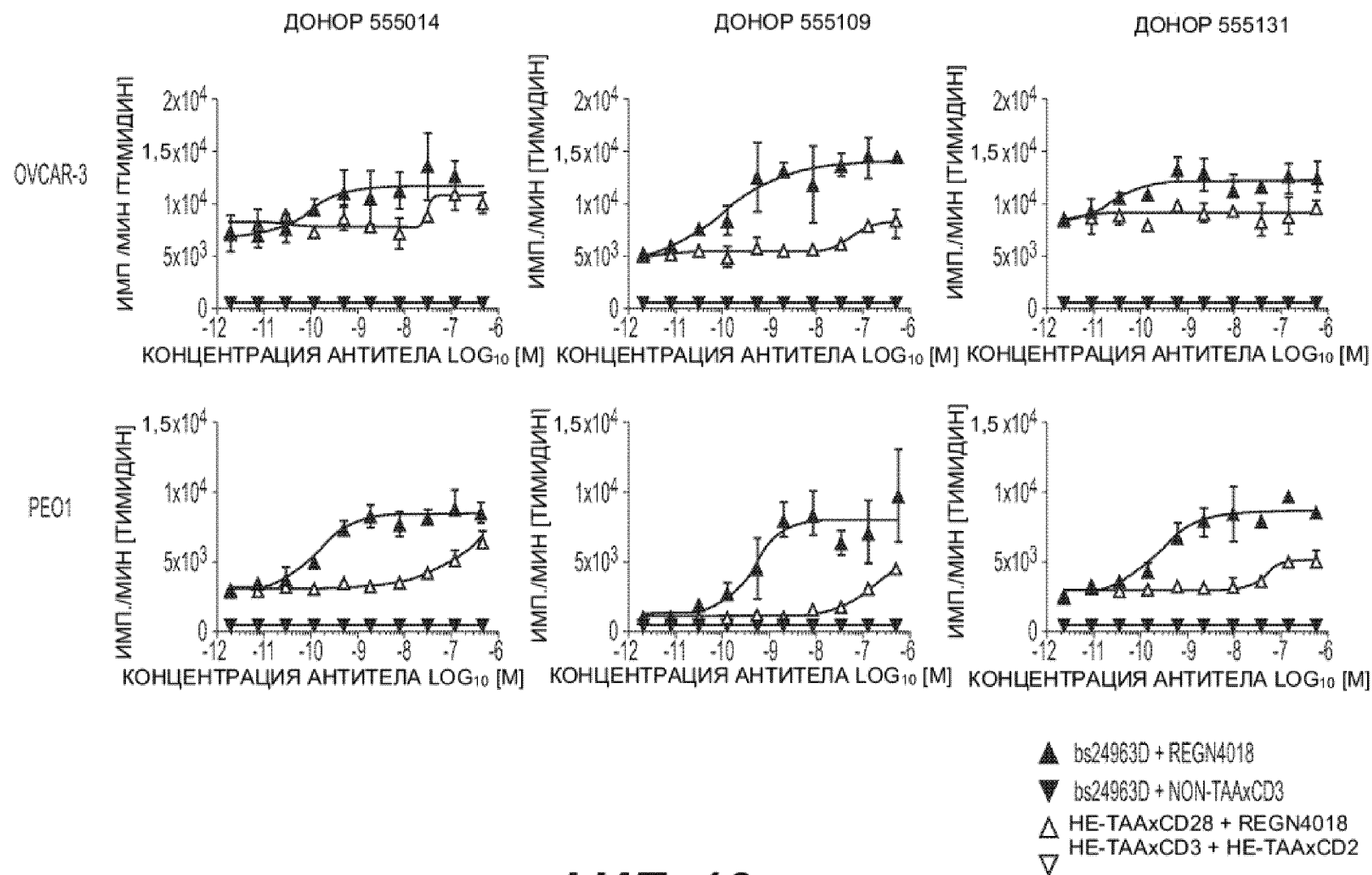


ФИГ. 11В

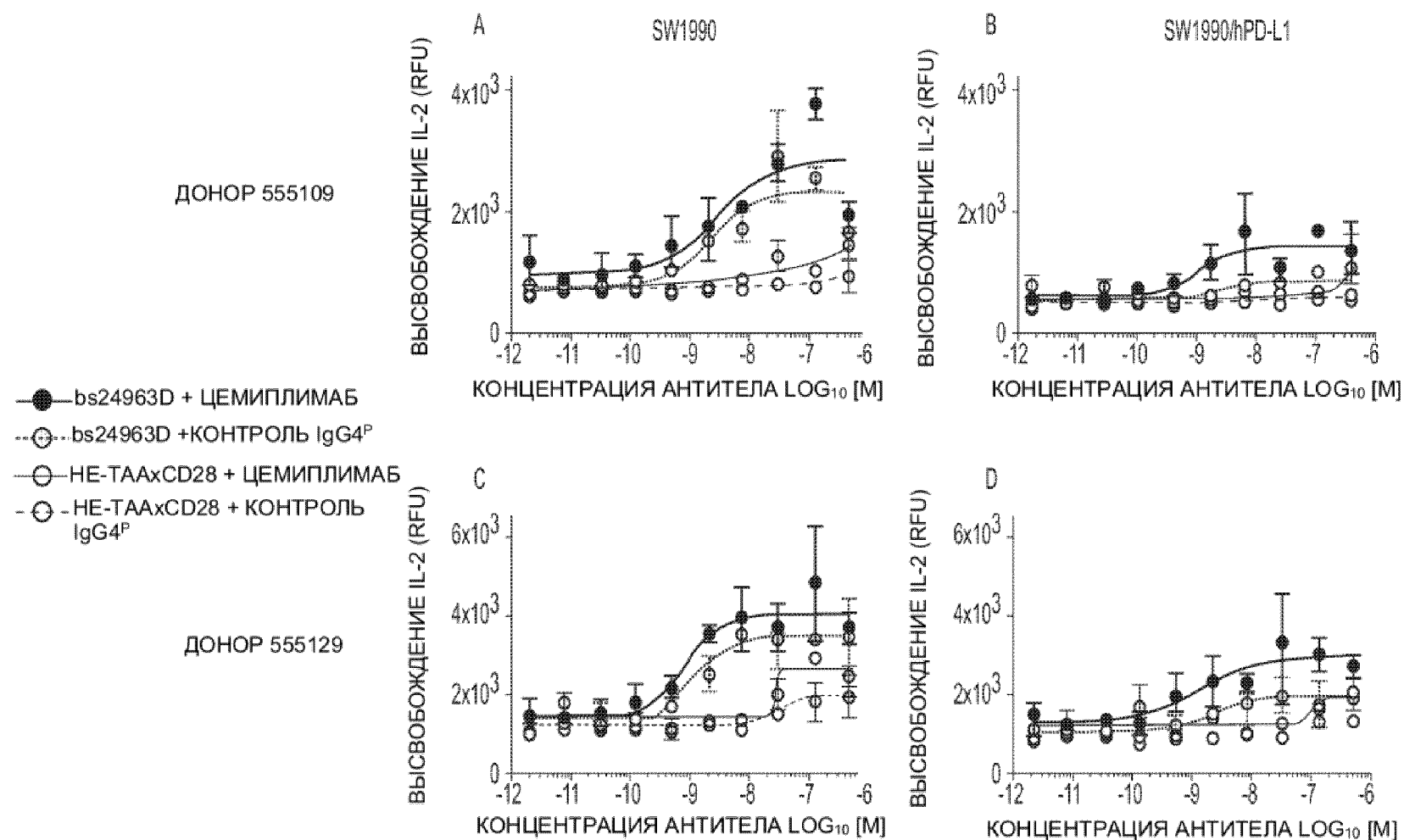


- ▲ bs24963D + REGN4018
- ▼ bs24963D + NON-TAAxCD3
- △ HE-TAAxCD28 + REGN4018
- ▽ HE-TAAxCD3 + HE-TAAxCD2

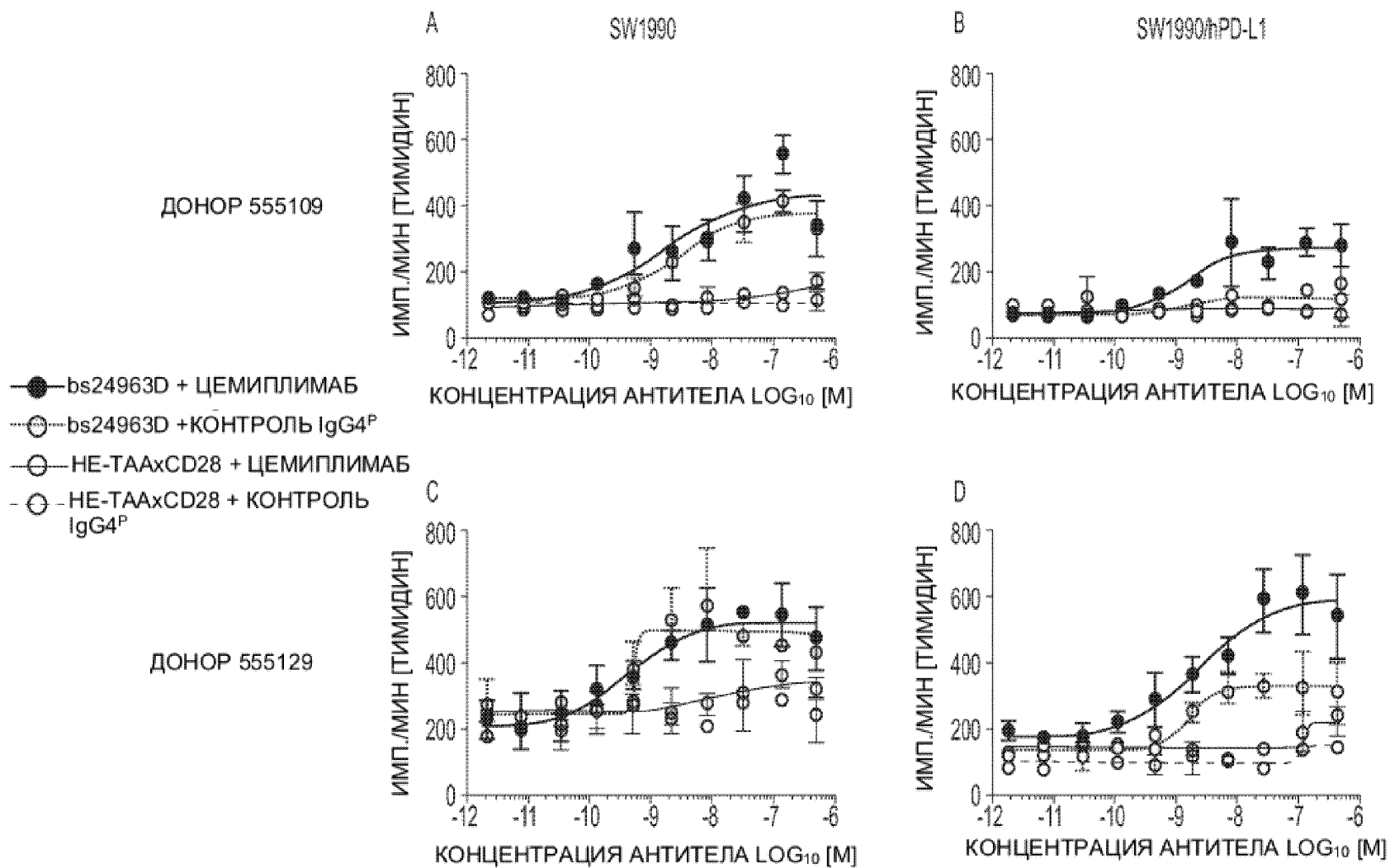
ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15