



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.26

(21) Номер заявки
201791075

(22) Дата подачи заявки
2015.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА CD3xCD20

(31) 62/080,716; 62/160,788

(32) 2014.11.17; 2015.05.13

(33) US

(43) 2017.11.30

(86) PCT/US2015/061139

(87) WO 2016/081490 2016.05.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Смит Эрик, Дэвис Самьюэл, Варгиз
Бинду, Кишнер Джессика Р., Терстон
Гэвин, Лови Израэль, Браунштейн
Кэрри (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2014047231
MICHAEL STANGLMAIER ET AL.: "Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 123, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1181-1189, XP55089407, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.23626, the whole document

PAVEL STROP ET AL.: "Generating Bispecific Human IgG1 and IgG2 Antibodies from Any Antibody Pair", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 420, no. 3, 17 April 2012 (2012-04-17), pages 204-219, XP028521423, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2012.04.020 [retrieved on 2012-04-25], the whole document

LUM LAWRENCE G. ET AL.: "CD20-Targeted T Cells after Stem Cell Transplantation

for High Risk and Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma", BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, KLUGE CARDEN JENNINGS PUBLISHING, CHARLOTTESVILLE, VA, US, vol. 19, no. 6, 22 March 2013 (2013-03-22), pages 925-933, XP028543753, ISSN: 1083-8791, DOI: 10.1016/J.BBMT.2013.03.010, the whole document

RAYMUND BUHMANN ET AL.: "Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dos", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 11, no. 1, 2 July 2013 (2013-07-02), page 160, XP021155527, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-11-160, the whole document

L. G. LUM ET AL.: "Multiple infusions of CD20-targeted T cells and low-dose IL-2 after SCT for high-risk non-Hodgkin's lymphoma: A pilot study", BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 49, no. 1, 23 September 2013 (2013-09-23), pages 73-79, XP550241883, GB ISSN: 0268-3369, DOI: 10.1038/bmt.2013.133, the whole document

R. BUHMANN ET AL.: "Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion", BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 43, no. 5, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 383-397, XP55022699, ISSN: 0268-3369, DOI: 10.1038/bmt.2008.323, the whole document

WO-A1-2014121087

WO-A1-2015143079

L. L. SUN ET AL.: "Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 7, no. 287, 13 May 2015 (2015-05-13), pages 287ra70-287ra70, XP55241859, Washington, DC ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4802, the whole document

(57) Изобретение относится к способу (схеме дозирования) введения биспецифического антитела CD3xCD20 пациенту-человеку, включающему: (а) введение первой дозы указанного антитела в определенной дозировке и после этого (b) введение второй дозы указанного антитела через определенный промежуток времени, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу. Способы согласно изобретению (и, аналогично, схемы дозирования согласно изобретению) также подходят для лечения В-клеточного (CD20-положительного) рака у пациента-человека или для уменьшения интенсивности и/или предупреждения патологического состояния путем периодического или постоянного введения биспецифического антитела CD3xCD20 пациенту-

человеку. Настоящее изобретение также относится к применению биспецифического антитела CD3хCD20 для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе или схеме лечения, указанных в любом из предыдущих пунктов. Фармацевтическая упаковка или набор, содержащие первую дозу, вторую дозу и любые последующие дозы, также являются частью настоящего изобретения.

039429 B1

039429 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/080716, поданной 17 ноября 2014 г., и предварительной заявки на патент США № 62/160788, поданной 13 мая 2015 г., полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит Перечень последовательностей, поданный в машиночитаемом формате в виде файла под названием 10162WO01_ST25.txt, созданного 3 июня 2014 г. (83392 байт).

Область техники

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, нацеленным на антигены CD20 и CD3, и способам уничтожения опухолей. Также настоящее изобретение относится к способам уменьшения и/или регулирования эффекторных функций, что может быть достигнуто в результате связывания Fc в сочетании с терапией антителами для лечения опухолей.

Уровень техники

Биспецифическое антитело, имеющее CD20-связывающее плечо и CD3-связывающее плечо, может обеспечивать необходимое перекрестное действие для усиления противоопухолевой активности. Третью модальность такого биспецифического антитела представляет Fc-домен. Было обнаружено, что модификация Fc-связывающих свойств усиливает противоопухолевую эффективность терапевтического антитела.

Связывание Fc-домена иммуноглобулина со своими рецепторами приводит эффекторные клетки к участкам связанного антигена, что в конечном итоге приводит к разнообразным сигнальным и иммунным ответам. Эти разнообразные "эффекторные функции", такие как КЗЦ и АЗКЦ являются результатами образования иммуноглобулинами класса G (IgG) комплекса между Fab-доменом IgG и антигеном-мишенью, при этом Fc-домен IgG связывается с Fc-рецепторами на эффекторных клетках. Некоторые эффекторные функции IgG не зависят от связывания антигена и включают функции, такие как уровни в сыворотке циркулирующей крови и способность переносить Ig через барьеры. Другие эффекторные функции считаются важными для применения иммуноглобулиновой терапии, такой как лечение рака. В частности, считается, что механизм АЗКЦ является одним из основных противоопухолевых механизмов терапевтических антител, уже имеющихся на рынке, таких как растузумаб (метастатический рак молочной железы) и ритуксимаб (неходжкинская лимфома).

Современные терапевтические стратегии, как правило, предполагают, что снижение эффекторных функций (или снижение связывания Fc-гамма-рецепторов) модифицированными Fc-доменами антител может быть целесообразным для антител, целью которых является нейтрализация или ингибирование биологической активности антигена (например, антитела - блокаторы или антагонисты) или активация или инициация последующей клеточной сигнализации (например, антитела агонисты).

Однако разработка нацеленных на опухоль антител со сниженной эффекторной функцией противоречит концепции опухолевой терапии, так как ожидается, что сниженная цитотоксичность (т.е. АЗКЦ и КЗЦ) клеток-мишеней не будет эффективной для лечения заболевания, т.е. разрушения опухолевых клеток или ингибирования роста опухоли.

В одной из описанных в данном документе стратегий применяют дифференциальное связывание Fc-рецептора в комбинации с биспецифическим связыванием антигена для специфического нацеливания на опухолевые маркеры, а также для запуска опухолеспецифического уничтожения Т-клеток. Fc-домен антитела конструируют так, чтобы тщательно регулировать связывание Fc-рецептора для прекращения или снижения нежелательного уничтожения клеток, таких как Т-клетки, естественные клетки-киллеры и макрофаги, несущие Fc-рецепторы. Уникальный профиль связывания в отношении взаимодействий Fc-рецептора, включающий взаимодействия связывания FcγRII-рецептора, но не включающий взаимодействия FcγRI или FcγRIII, неожиданно оказался благоприятным для нацеленной на опухоли терапии Ig в контексте биспецифических антител, которые связывают как CD3, так и CD20. При этом все еще существует потребность в нахождении новых видов терапии, которые стимулируют иммунную систему и эффективны для абляции опухолей, не приводя при этом к избыточному высвобождению цитокинов и токсичности для пациента.

Современные биспецифические виды терапии, такие как антитела BiTE® (биспецифический активатор Т-клеток) вводят чрезвычайно малыми дозами, однако с частыми интервалами. Существует неудовлетворенная медицинская потребность в дополнительных вариантах лечения с переносимыми режимами дозирования для пациентов с В-клеточными CD20+ злокачественными опухолями, в особенности для пациентов, у которых наблюдается рецидив или прогрессирование после начальной терапии.

Сущность изобретения

В первом аспекте в настоящем изобретении предложены биспецифические антитела с измененными Fc-связывающими доменами, которые связывают человеческие CD3 и CD20 и дополнительно сконструированы так, чтобы обладать специальными эффекторными функциями, которые не характерны для естественного репертуара иммунной системы. Антитела в соответствии с этим аспектом изобретения применимы, помимо прочего, для нацеливания на Т-клетки, экспрессирующие CD3, и для стимуляции

активации Т-клеток, например в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение является благоприятным или желательным как часть действия биспецифического антитела, которое направляет CD3-опосредованную активацию Т-клеток на определенные типы клеток, такие как опухолевые клетки с антигеном CD20. Антитела согласно изобретению вводят в соответствии с протоколом, подразумевающим повышение дозы, для усиления их эффективности в отношении стимуляции иммунной системы, т.е. активации Т-клеток, минимизируя при этом токсические эффекты, например цитокиновую бурю.

В другом аспекте в изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения или уменьшения интенсивности В-клеточного рака или способ лечения субъекта, включающий введение первой дозы антитела в течение первого периода времени и последовательное введение второй дозы указанного антитела в течение второго периода времени, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, а биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, а лечение или уменьшение интенсивности рака включает: (a) подавление роста опухоли у субъекта, (b) опосредование лизиса В-клеток у субъекта, (c) лечение В-клеточного рака у субъекта, (d) лечение рака, положительного в отношении экспрессии CD20, у субъекта, или (e) лечение CD20-экспрессирующего меланомного рака у субъекта.

В другом аспекте в изобретении предложено применение биспецифического антитела для лечения или уменьшения опухолевой нагрузки или рака или способ лечения субъекта, включающий введение первой дозы антитела в течение первого периода времени и последовательное введение второй дозы указанного антитела в течение второго периода времени, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, а биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий опухолевый антиген-мишень или опухолеспецифический антиген, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, а лечение или уменьшение опухолевой нагрузки или рака включает: (a) подавление роста опухоли у субъекта, (b) опосредование лизиса опухолевых клеток у субъекта, (c) лечение рака, положительного в отношении экспрессии опухолевого антигена-мишени или опухолеспецифического антигена, у субъекта или (d) лечение экспрессирующего опухолевый антиген-мишень рака или экспрессирующих опухолеспецифический антиген опухолей у субъекта.

Типовые анти-CD3/CD20 антитела согласно настоящему изобретению перечислены в табл. 1-8 в данном документе. В табл. 1 приведены обозначения аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), а также определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типовых биспецифических антител. В табл. 2 приведены обозначения последовательностей молекул нуклеиновых кислот, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типовых биспецифических антител. В табл. 3 приведены обозначения комбинаций аминокислотных последовательностей типовых биспецифических антител, включая комбинации HCVR, константной области тяжелой цепи (CH) и LCVR. В табл. 4 приведены обозначения нуклеотидных последовательностей для комбинаций молекул нуклеиновых кислот, кодирующих комбинации HCVR, константной области тяжелой цепи (CH) и LCVR типовых биспецифических антител.

В табл. 5 описаны обозначения аминокислотных последовательностей для примеров тяжелой цепи согласно изобретению, при этом биспецифическое антитело содержит HCVR, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из табл. 5, спаренную с CH согласно изобретению. В табл. 6 отдельно описаны обозначения аминокислотных последовательностей для примеров легкой цепи согласно изобретению, при этом биспецифическое антитело содержит LCVR, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из табл. 6.

В настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую пару аминокислотных последовательностей из типовых анти-CD3/CD20 антител, приведенных в табл. 2. В определенных вариантах реализации изобретения пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, Антитело 1 и Антитело 2).

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, со-

держащие тяжелую цепь CDR1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь CDR2 (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь CDR3 (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь CDR1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь CDR2 (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь CDR3 (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую аминокислотные последовательности HCDR3, приведенные в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1, так, что пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, Антитело 1 или Антитело 2).

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), приведенных в табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 представлена SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24; или 12-14-16-20-22-24 (например, Антитело 1 и Антитело 2).

В родственном варианте реализации в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, указанных для типовых антител, приведенных в табл. 1. Например, в настоящее изобретение включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 (например, Антитело 1 и Антитело 2). Способы и методики определения CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и применимы для определения CDR в пределах конкретных раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR. Типовые методики, которые можно применять для определения границ CDR, включают, например, определение Кабата, определение Хотиа и определение AbM. В общих словах, определение Кабата основано на вариативности последовательностей, определение Хотиа основано на расположении областей структурных петель, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Кабата и Хотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также для определения последовательностей CDR антитела доступны открытые базы данных.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их части, например, в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR или LCVR, приведенные в табл. 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей HCVR/LCVR, приведенных в табл. 2,

или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности HCDR1 или HCDR2 или HCDR3, приведенные в табл. 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCDR1 или HCDR2 или HCDR3, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1 или LCDR2 или LCDR3, приведенные в табл. 1; в определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCDR1 или LCDR2 или LCDR3, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие HCVR, причем HCVR содержит группу из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 соответствует указанной для типовых анти-CD3 антител, приведенных в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие LCVR, причем LCVR содержит группу из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где группа аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответствует указанной для типовых анти-CD3 антител, приведенных в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие как HCVR, так и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, а LCVR содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. В определенных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей. В определенных вариантах реализации в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, причем HCVR и LCVR получены из одного анти-CD3 антитела, приведенного в табл. 1.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), содержащую аминокислотную последовательность выбранную из аминокислотных последовательностей CH, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходную с ними последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из нуклеотидных последовательностей CH, приведенных в табл. 2, или в значительной степени сходной с ними последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные экспрессионные векторы, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи анти-CD3 антитела и вариабельную область тяжелой или легкой цепи анти-CD20 антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любые вышеуказанные молекулы нуклеиновых кислот, т.е. молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR и/или последовательностей CH, приведенных в табл. 1 и 2. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были внесены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих выработку антител или фрагментов антител, и выделения полученных таким образом антител или фрагментов антител.

В другом аспекте в изобретении предложено терапевтически эффективное количество рекомбинантного человеческого антитела или его фрагмента, которое специфически связывает CD3 и CD20, причем антитело содержит химерный Fc-домен, и фармацевтический приемлемый носитель. В родственном

аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/CD20 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте реализации изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который обеспечивает преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 антителом. Типовые агенты, которые могут обеспечивать преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 антителом, включают, без ограничений, другие агенты, которые связывают и/или активируют сигнализацию CD3 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или другие агенты, которые напрямую не связывают CD3, но, тем не менее, активируют или стимулируют активацию иммунных клеток или усиливают уничтожение опухоли. Дополнительные варианты комбинированной терапии и совместные составы, включающие анти-CD3 антитела согласно настоящему изобретению, раскрыты в другом месте данного документа.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 и антиген-мишень, причем молекула содержит химерный Fc-домен, имеющий сниженную эффекторную функцию. В определенном варианте реализации изобретения молекула содержит описанный в данном документе химерный Fc-домен. В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы связывают CD3 и CD20; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также называются в данном документе "анти-CD3/анти-CD20 биспецифическими молекулами". Анти-CD20 часть анти-CD3/анти-CD20 биспецифической молекулы применима для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют CD20 (например, В-клеточные опухоли), а анти-CD3 часть биспецифической молекулы применима для активации Т-клеток. Одновременное связывание CD20 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке опосредует направленное уничтожение (клеточный лизис) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой, которое облегчается эффекторными клетками, которые связывают химерный Fc-домен. Следовательно, анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению применимы, помимо прочего, для лечения заболеваний или нарушений, связанных или вызванных CD20-экспрессирующими опухолями (например, лимфомами и меланомными опухолями).

Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению дополнительно обеспечивают способ достижения регрессии CD20-положительных опухолей. Следовательно, в изобретении предложен способ лечения В-клеточного рака у субъекта, включающий введение терапевтического количества анти-CD3/анти-CD20 биспецифических молекул согласно изобретению, причем указанного количества достаточно для снижения опухолевой нагрузки, достижения регрессии опухоли или снижения развития опухоли у субъекта.

Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы согласно изобретению дополнительно обеспечивают способ подавления или достижения регрессии CD20-положительной меланомы. Следовательно, в изобретении предложен способ лечения меланомы у субъекта, включающий введение терапевтического количества анти-CD3/анти-CD20 биспецифических молекул согласно изобретению, причем указанного количества достаточно для ингибирования роста опухоли, снижения опухолевой нагрузки или снижения развития опухоли у субъекта.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, и химерный Fc-домен. Настоящее изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы (например, биспецифические антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), сопряженную с вариабельной областью легкой цепи (LCVR). В определенных типовых вариантах реализации изобретения анти-CD3 антигенсвязывающий домен и анти-CD20 антигенсвязывающий домен содержат разные, отличающиеся HCVR, сопряженные с общей LCVR. Например, как проиллюстрировано в примере 2 данного документа, конструировали биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, причем первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, полученную из анти-CD3 антитела; и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, причем второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученную из анти-CD20 антитела, сопряженную с LCVR, полученной из анти-CD3 антитела (например, ту же LCVR, которая входит в состав анти-CD3 антигенсвязывающего домена). Другими словами, в типовых раскрытых в данном документе молекулах сопряжение HCVR из анти-CD20 антитела с LCVR из анти-CD3 антитела приводит к созданию антигенсвязывающего домена, который специфически связывает CD20 (но не связывает CD3). В таких вариантах реализации изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержат разные анти-CD3 и анти-CD20 HCVR, но имеют общую анти-CD3 LCVR.

В настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1 или 2. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, также может содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3,

содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, приведенных в табл. 1 или 2. В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, приведенных в табл. 1 или 2, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, приведенных в табл. 1 или 2.

В соответствии с определенными вариантами реализации в настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 10, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 16, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 24, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В определенных вариантах реализации изобретения первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащих SEQ ID NO: 16/24.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 12, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 14, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 20, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 22, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Определенные неограничивающие типовые анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, имеющие соответственно аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вариативную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вари-

бельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18 или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей. В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 75, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащих SEQ ID NO: 2/18 или SEQ ID NO: 2/75.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 24, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В определенных вариантах реализации изобретения второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащих SEQ ID NO: 8/24.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или в значительной степени сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Определенные неограничивающие типовые анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, имеющие соответственно аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (например, Антитело 1 и Антитело 2).

В родственном варианте реализации изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в последовательностях вариабельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR) SEQ ID NO: 2/18.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые последовательности HCVR, LCVR или CDR раскрытых в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифических антигенсвязывающих молекул, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотидные последовательности, приведенные в табл. 2, 7 и 8, а также молекулы нуклеиновых кислот, содержащие по две полинуклеотидные последовательности, приведенные в табл. 2, 7 и 8, в любой функциональной комбинации или упорядочении. Также в изобретение включены рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие нуклеиновые кислоты согласно изобретению, и клетки-хозяева, в которые были внесены такие векторы, а также способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих выработку антител, и выделения полученных антител.

Настоящее изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в которых любой из вышеуказанных антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD3, скомбинирован, соединен или каким-либо другим образом связан с любым из вышеуказанных антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD20, для образования биспеци-

фической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD3 и CD20.

В другом аспекте в изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и химерный Fc-домен, связанный с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов. В родственном аспекте биспецифическое антитело способно специфически связываться с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB. В настоящем изобретении предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые предпочтительно связываются с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB и проявляют слабую или отсутствующую аффинность связывания в отношении человеческого FcγRI или человеческого FcγRIII. Биспецифические антитела согласно изобретению способны специфически связываться с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB с более высокой аффинностью, чем эти антитела связываются с человеческим FcγRI или человеческим FcγRIII, согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело специфически связывается как с человеческим FcγRIIA, так и с человеческим FcγRIIB, и проявляет аффинность связывания с K_d менее 1 мкМ в отношении каждого из человеческого FcγRI и человеческого FcγRIII согласно данным *in vitro* анализа.

В других аспектах в изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый и второй полипептид тяжелой цепи, каждый содержащий химерный Fc-домен, причем первый полипептид тяжелой цепи содержит антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, а второй полипептид тяжелой цепи содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20.

В других вариантах реализации изобретения, антитело проявляет большую аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA по сравнению со связыванием человеческого FcγRIIB согласно данным *in vitro* анализа. В других вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим FcγRIIA и демонстрирует меньшее значение K_d по сравнению со связыванием человеческого FcγRIIB согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим FcγRIIA при 25°C со значением K_d от 10 до 30 мкМ согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с человеческим FcγRIIB при 25°C со значением K_d от 100 и 250 мкМ согласно данным *in vitro* анализа.

В другом варианте реализации изобретения антитело проявляет слабую или не определяемую аффинность связывания с человеческим FcγRI согласно данным *in vitro* анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет слабую или не определяемую аффинность связывания с человеческим FcγRIII согласно данным *in vitro* анализа.

В некоторых вариантах реализации изобретения *in vitro* анализ представляет собой анализ методом поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет пренебрежимо малую или не определяемую антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет сниженную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа цитотоксичности.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет менее 50% комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) от общей популяции клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет пренебрежимо малую или не определяемую комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет сниженное уничтожение клеток, несущих Fc-рецепторы, таких как NK-клетки или макрофаги, по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет сниженное уничтожение Т-клеток, несущих Fc-рецепторы, NK-клетками или макрофагами по сравнению с антителом, содержащим Fc-домен дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIIA, которая превышает его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIIB, которая превышает его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRI, которая превышает или равна его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIII, согласно данным *in vitro* анализа. В других вариантах реализации изобретения антитело проявляет K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIIA > чем с человеческим FcγRIIB > чем с человеческим FcγRI > чем с человеческим FcγRIII согласно данным *in vitro* анализа.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело проявляет K_d аффинности связывания с

человеческим FcγRIIA, которая превышает его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIIB, которая превышает его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIII, которая превышает или равна его K_d аффинности связывания с человеческим FcγRI, согласно данным *in vitro* анализа. В других вариантах реализации изобретения антитело проявляет K_d аффинности связывания с человеческим FcγRIIA > чем с человеческим FcγRIIB > чем с человеческим FcγRIII > чем с человеческим FcγRI согласно данным *in vitro* анализа.

В некоторых вариантах реализации изобретения человеческий FcγRIII представляет собой человеческий FcγRIIIA или человеческий FcγRIIIB.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный Fc-домен содержит химерную шарнирную область.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, второй антигенсвязывающий домен и химерную константную область тяжелой цепи (CH), причем (a) первый антигенсвязывающий домен связывает CD3, (b) второй антигенсвязывающий домен связывает CD20. В определенных аспектах изобретения химерная CH-область связывается с большей аффинностью с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа. В другом аспекте химерная CH-область связывается с меньшей или отсутствующей аффинностью с человеческим FcγRI и человеческим FcγRIII по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, согласно данным *in vitro* анализа.

В изобретении предложены биспецифические антитела, содержащие химерную шарнирную область. В некоторых аспектах химерная шарнирная область содержит остатки аминокислотных последовательностей от позиции 216 до 236 (нумерация EU). Сконструированы биспецифические антитела согласно изобретению, в которых химерная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность нижней шарнирной области человеческого IgG2

PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) от позиции 228 до 236 (нумерация EU). В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению содержат химерную шарнирную область, а верхняя химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 (нумерация EU) верхней шарнирной области IgG1. В других вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению содержат химерную шарнирную область, а верхняя химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки от позиции 216 до 227 (нумерация EU) верхней шарнирной области IgG4.

В одном варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность химерной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53). В другом варианте реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность химерной шарнирной области ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54). В определенных вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность CH2-домена человеческого IgG4 от позиции 237 до 340 (нумерация EU). В других вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит CH3-домен, полученный из CH3-домена человеческого IgG1 или CH3-домена человеческого IgG4. В других вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит CH1-домен человеческого IgG1 и CH3-домен человеческого IgG1. В дополнительных вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело содержит CH1-домен человеческого IgG4 и CH3-домен человеческого IgG4.

В одном аспекте в изобретении предложен способ получения биспецифического антитела, содержащего химерную константную область тяжелой цепи, включающий: (a) трансфекцию клетки-хозяина молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую легкую цепь, способную связывать антиген CD3, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-область, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CL-область Ig, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-область выбранного антиген-специфического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны между собой; (b) трансфекцию клетки-хозяина с этапа (a) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь антитела, способного связывать антиген CD3, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную константную CH-область человеческого Ig, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-область, и нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально связаны между собой; при этом CH-область кодирует одну или более аминокислотных модификаций в CH3-доме, которые снижают или устраняют связывание второго CH3-домена с протеином A; (c) трансфекцию клетки-хозяина с этапа (a) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь антитела, способного связывать антиген CD20, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область, и нуклеотидную последовательность, кодирующую химерную CH-область человеческого Ig, причем указанная нуклеотидная последовательность, ко-

дирующая VH-область, и нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально связаны между собой; и (с) получение указанного антитела путем коэкспрессии молекул нуклеиновых кислот по (а) и (b) в указанной клетке-хозяине.

В некоторых аспектах способ получения биспецифического антитела необязательно включает трансфекцию клетки-хозяина с этапа (а) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую легкую цепь, способную связывать антиген CD20, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-область второй легкой цепи, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CL-область Ig, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-область второй легкой цепи, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны между собой.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая тяжелая цепь содержит CH3-область, содержащую модификацию H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU).

В другом варианте реализации изобретения первая тяжелая цепь содержит CH3-область, дополнительно содержащую модификацию Y96F (IMGT; Y436F согласно нумерации EU). В дополнительных вариантах реализации изобретения способ включает выделение антитела с помощью протеина А.

В другом аспекте изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее: (а) первую тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающий домен, способный распознавать и связывать первый антиген-мишень, (b) вторую тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающий домен, способный распознавать и связывать второй антиген-мишень, и (с) общий антигенсвязывающий домен легкой цепи, способный распознавать и связывать первый или второй антиген-мишень, причем тяжелая цепь (а) или (b) или обеих (а) и (b) содержит константную область тяжелой цепи (CH), содержащую химерную шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

В определенных вариантах реализации изобретения константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах реализации изобретения химерная CH-кодирующая нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33. В других вариантах реализации изобретения химерная нуклеотидная последовательность CH кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность CH-области содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33.

В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую легкую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34.

В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 36.

В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39.

В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41.

В определенных аспектах биспецифическое антитело содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В других аспектах биспецифическое антитело содержит кодирующую тяжелую цепь молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 43.

В другом аспекте в изобретении предложено терапевтически эффективное количество раскрытой в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы и второго терапевтического агента. В одном варианте реализации изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который обеспечивает преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулой. Типовые агенты, которые могут обеспечивать преимущество в комбинации с анти-CD3/CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулой, подробно обсуждаются в другом месте данного документа.

В другом аспекте в изобретении предложены терапевтические способы для нацеливания на опухолевые клетки/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, с помощью анти-CD3/анти-

CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению, причем терапевтические способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-CD3/анти-CD20 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтические способы для нацеливания на опухолевые клетки/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, с помощью анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы или антитела согласно изобретению включают введение первой дозы антигенсвязывающей молекулы или антитела в течение первого периода времени и последующее введение второй дозы указанного антитела в течение второго периода времени, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу.

В некоторых вариантах реализации изобретения применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы включает введение первой дозы антитела в течение первого периода времени и последующее введение второй дозы указанного антитела в течение второго периода времени, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу. В определенных аспектах первая доза антитела и вторая доза антитела находятся в подходящем составе.

Настоящее изобретение включает применение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению в производстве медикамента для лечения заболевания или нарушения, связанного или вызванного экспрессией CD20.

Настоящее изобретение также включает биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, второй антигенсвязывающий домен и химерную константную область тяжелой цепи (CH), причем: первый антигенсвязывающий домен связывает CD3, второй антигенсвязывающий домен связывает CD20, химерная CH-область связывается с большей аффинностью с человеческим FcγRIIA и человеческим FcγRIIB по сравнению с антителом, содержащим CH-область дикого типа, а такое биспецифическое антитело предназначено для применения в производстве медикамента. В изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, и химерную CH-область, которая связывается с большей аффинностью с человеческим FcγRIIA по сравнению со связыванием с человеческим FcγRIIB, для применения в производстве медикамента.

Другие варианты реализации станут очевидны после изучения нижеследующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрированы шарнирные аминокислоты, применяемые при конструировании химерных шарнирных областей, и соответствующие системы нумерации аминокислот.

На фиг. 2 представлена аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG1, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанные какIGHG1 в UniProtKB/Swiss-Prot Accn. № P01857 (SEQ ID NO: 45).

На фиг. 3 представлена аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG2, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанные какIGHG2 в UniProtKB/Swiss-Prot Accn. № P01859 (SEQ ID NO: 46).

На фиг. 4 представлена аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, включая CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены, описанные какIGHG4 в UniProtKB/Swiss-Prot Accn. № P01861 (SEQ ID NO: 47).

Фиг. 5A и 5B: Кривые доза-ответ, иллюстрирующие отсутствие активности КЗЦ в отношении клеток Daudi (фиг. 5A) и Raji (фиг. 5B) в присутствии антител, имеющих дикого типа или химерные шарнирные C_H-области. ("Контрольное" Антитело 4=биспецифическое Ab с C_H IgG1 дт; Антитело 1; Антитело 2; изотипический контрольный IgG1=неспецифическое Ab с дт IgG1 CH).

Фиг. 6A и 6B: Кривые доза-ответ, иллюстрирующие отсутствие активности АЗКЦ в отношении клеток Daudi (фиг. 6A) и Raji (фиг. 6B) в присутствии антител, имеющих дикого типа или химерные шарнирные C_H-области. ("Контрольное" Антитело 4=биспецифическое Ab с C_H IgG1 дт; Антитело 1; Антитело 2; изотипический контрольный IgG1=неспецифическое Ab с C_H IgG1 дт).

На фиг. 7A-7F проиллюстрирован объем опухоли (в мм³) в течение времени у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК (или не содержащий МКПК контроль - фиг. 7D), при этом CD3хCD20 биспецифическое антитело согласно изобретению (Ab 1) или базовый раствор, или контрольное антитело вводили после имплантации и лечения опухоли, начиная в день имплантации опухоли (день 0), и проводили измерения в течение 25 дней. Фиг. 7A: Ни одна из мышей не демонстрировала ингибирование роста опухоли при обработке базовым раствором; фиг. 7B: 1 из 5 (1/5) мышей демонстрировала ингибирование роста опухоли при обработке 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FcD1 Ab); фиг. 7C: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,4 мг/кг Антитела 1 (Ab 1); фиг. 7D: 0/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли в отсутствие имплантированных МКПК и при обработке 0,4 мг/кг Ab1; фиг. 7E: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,04 мг/кг Ab1 и фиг. 7F: 5/5 мышей демонстрировали ингибирование роста опухоли при обработке 0,004 мг/кг Ab1.

На фиг. 8А и 8В проиллюстрирован объем опухоли (в мм³) в течение времени у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК и которых обрабатывали Ab1 (CD3хCD20-химерный Fc), по сравнению с контролем, с или без пополнения IgG (фиг. 8А), или обрабатывали Ab4 (CD3хCD20-дт Fc) по сравнению с контролем, с или без добавления IgG (фиг. 8В). В этой модели оба CD3хCD20 биспецифических антитела демонстрируют значительное ингибирование роста опухоли при добавлении IgG. Как видно на фиг. 8А, биспецифическое антитело CD3хCD20-химерный Fc (Ab 1) демонстрирует в этом эксперименте полное ингибирование роста опухоли в течение периода исследования с или без добавления IgG.

На фиг. 9 проиллюстрирована регрессия развившихся опухолей (~200-400 мм³) на 14-й день у мышей NSG, обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом. Мышам NSG подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК (сингенные по HLA-антигенам клетки) за 15 дней до лечения, затем опухолям давали развиваться и проводили измерения. Мышей обрабатывали 0,4 мг/кг Антитела 1 (антитело CD3хCD20-химерный Fc) или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или базовым контрольным раствором раз в неделю (день 7, день 14, день 21).

На фиг. 10 проиллюстрирована регрессия развившихся опухолей (~500-900 мм³) на 21-й день у мышей NSG, обработанных CD3хCD20 биспецифическим антителом. Мышам NSG подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК (сингенные по HLA-антигенам клетки) за 15 дней до лечения, затем опухолям давали развиваться и проводили измерения. Мышей обрабатывали 0,4 мг/кг Антитела 1 (антитело CD3хCD20-химерный Fc) или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или базовым контрольным раствором раз в неделю (день 7, день 14, день 21).

На фиг. 11А и 11В проиллюстрирована *in vivo* эффективность введения биспецифического антитела CD3хCD20, Антитела 1 и Антитела 4, по сравнению с введением моноспецифического антитела (ритуксимаб) путем определения изменений в уровнях В-клеток CD20+ или уровнях Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков на 7 день исследования. Антитела или плацебо вводили на день 0. Фиг. 11А: Уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день во всех образцах за исключением плацебо; фиг. 11В: На 2 день в периферической крови животных, обработанных биспецифическими антителами, наблюдали временное снижение числа Т-клеток, которое восстанавливалось до исходных уровней на 4 день. В группах обработки плацебо или ритуксимабом (Ритуксан) не наблюдали снижения числа Т-клеток (ниже исходного уровня).

На фиг. 12А и 12В проиллюстрирована *in vivo* эффективность введения биспецифического антитела CD3хCD20, Антитела 1 и Антитела 4, путем определения изменений в уровнях В-клеток CD20+ или уровнях Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков в долгосрочном (3 месяца) исследовании. Плацебо (базовый раствор) или биспецифические антитела вводили в дозировке 1,0 мг/кг на день 0. Фиг. 12А: Уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день и оставались сниженными в течение времени исследования во всех образцах за исключением плацебо; фиг. 12В: Для животных, обработанных биспецифическими антителами, наблюдали временное снижение числа Т-клеток на 2 день, затем на 4 день число Т-клеток восстанавливалось до исходных уровней и оставалось в пределах исходного уровня в течение всего исследования (>80 дней). У животных, обработанных плацебо, не наблюдали снижения числа Т-клеток.

На фиг. 13А и 13В проиллюстрирована *in vivo* эффективность введения низкой дозы биспецифического антитела CD3хCD20, Антитела 1 и Антитела 4, путем определения изменений в уровнях В-клеток CD20+ или уровнях Т-клеток CD3+ в периферической крови яванских макаков в долгосрочном (2 месяца) исследовании. Биспецифические антитела вводили в дозировке 0,01 мг/кг или 0,001 мг/кг (1 мкг/кг) на день 0. Фиг. 13А: Уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день и оставались сниженными в течение времени исследования, аналогично тому, что наблюдали у животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (также см. фиг. 11А или 12А); фиг. 13В: Животные, обработанные очень низкими дозами (1 мкг/кг) биспецифических антител, демонстрировали такое же временное снижение числа Т-клеток и восстановление, которое наблюдали у животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (также см. фиг. 11В или 12В).

На фиг. 14 проиллюстрирована корреляция снижения числа В-клеток со снижением количества антитела в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc Антителом 1. Так как количество антител (незакрашенные символы) в кровотоке животных снижается в течение времени, популяции В-клеток (закрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдалось на 81 день для животного № 106881 (закрашенные круги)).

На фиг. 15 проиллюстрирована корреляция снижения числа В-клеток со снижением количества антитела в периферической крови животных, обработанных 20-химерный Fc Антителом 2. Так как количество антител (незакрашенные символы) в кровотоке животных снижается в течение времени, популяции В-клеток (закрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдалось на 66 день для животного № 106876 (закрашенные треугольники) и на 68 день для животного № 106877 (закрашенные квадраты)).

На фиг. 16 проиллюстрирована корреляция снижения числа В-клеток со снижением количества ан-

титела в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-дт Fc (Ab 4) биспецифическим антителом. Так как количество антител (незакрашенные символы) в кровотоке животных снижается в течение времени, популяции В-клеток (закрашенные символы) начинают восстанавливаться (например, как наблюдалось на 91 день для животного № 106870 (закрашенные треугольники) и на 64 день для животного № 106872 (закрашенные квадраты)).

На фиг. 17А и 17В проиллюстрировано снижение числа тканевых В-клеток в селезенке (фиг. 17А) или брыжеечных лимфатических узлах (фиг. 17В) яванских макаков в результате введения CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом, при намного более низких дозах (дозах от 0,01 до 1,0 мг/кг), вводимых биспецифическим группам. Это снижение не наблюдали ни в одной из упомянутых тканей животных из обрабатываемой плацебо контрольной группы. Оба

CD3хCD20 биспецифических антитела (Ab1 и Ab4) приводили к дозозависимому снижению числа В-клеток в лимфоидных органах, а дозы биспецифических антител, равные или превышающие 0,1 мг/кг, снижали число В-клеток более эффективно, чем ритуксимаб.

На фиг. 18А и 18В проиллюстрировано, что CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию МКПК человека (фиг. 18А) или МКПК яванского макака (фиг. 18В) в *in vitro* биоанализе, тогда как контрольное Антитело 5 (-▲-; не специфическое к CD3хCD20) не демонстрирует активности.

На фиг. 19А и 19В проиллюстрировано CD3хCD20-опосредованное целевое уничтожение Raji в анализе цитотоксичности. Антитело 1 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC₅₀ 25,0 пМ и 9,10 пМ для Т-клеток человека (фиг. 19А) и яванского макака (фиг. 19В) соответственно. Антитело 4 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC₅₀ 15,7 пМ и 1,73 пМ для Т-клеток человека (фиг. 19А) и яванского макака (фиг. 19В) соответственно. Для контроля (-▲-) активности не наблюдали.

На фиг. 20А и 20В проиллюстрировано, что CD3хCD20 биспецифическое антитело опосредует уничтожение клеток наивными Т-клетками. На фиг. 20А проиллюстрирован типовой график рассеяния FACS для наибольшей исследуемой концентрации Антитела 4. Клетки B16F10.9 дикого типа метят CFDA-SE, а клетки B16F10.9/CD20 метят Violet Cell Tracker. Эффекторные клетки не метят. На второй панели фиг. 20А проиллюстрировано, что CD20-экспрессирующие клетки уничтожаются (нижний правый квадрант) путем обработки анти-CD3хCD20. На фиг. 20В проиллюстрирована доля выживших клеток B16F10.9/CD20 после 48 часов в присутствии CD20хCD3 антител, т.е. Антитела 4 (дт Fc), Антитела 1 (химерный Fc) или контрольного Ab 5, и МКПК. Процент выживаемости определяли путем сравнения процентной доли клеток B16F10.9/CD20 с CD20-отрицательными клетками B16F10.9 в популяции живых клеток. Ab 4 и Ab 1 специфическим образом направляли человеческие Т-клетки на уничтожение только клеток-мишеней, экспрессирующих CD20 (фиг. 20В), в смешанной популяции клеток. Целевое уничтожение клеток наблюдали только в присутствии биспецифических антител, при этом число клеток B16F10.9/CD20 снижалось дозозависимым образом Антителом 4 (EC₅₀ 12,8 пМ) и Антителом 1 (EC₅₀ 19,5 пМ) (фиг. 20В). Менее 5% CD20-экспрессирующих клеток оставались живыми при наибольшей исследуемой дозе (10 мкг/мл).

На фиг. 21 проиллюстрирована процентная доля активированных (CD69+) клеток из общего числа эффекторных клеток CD2+ в 48-часовом анализе цитотоксичности с нацеливанием на клетки B16F10.9/CD20, при этом такая активация индуцировалась любым CD20хCD3 антителом, т.е. Антителом 4 (дт Fc) или Антителом 1 (химерный Fc).

На фиг. 22А и 22В проиллюстрировано, что CD3хCD20 биспецифическое антитело индуцировало кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями (клетками CD20+) посредством биспецифических связывающих плеч. Эффекторные клетки окрашены CFSE, а клетки CD20+ окрашены Violet Cell Tracker, и размещены в отдельных квадрантах. После инкубации с нерелевантным контрольным антителом (контрольное Антитело 5) в клеточной смеси не появляется никаких кластеров (двойное окрашивание) (фиг. 22А). После инкубации с CD3хCD20 биспецифическим антителом (Ab 4) проявляются клеточные кластеры, так как они окрашены как CFSE, так и Violet (смотрите левый верхний квадрант на графике рассеяния на фиг. 22В, выделенный жирным квадратом).

На фиг. 23 проиллюстрировано исследование объема опухоли (в мм³) у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и МКПК, при этом CD3хCD20 биспецифическое антитело согласно изобретению (Ab 1) при 0,4 мг/кг, 2Х/неделю (в.б.), нерелевантное контрольное антитело Ab 6 при 0,4 мг/кг, 2Х/неделю (в.б.) или базовый раствор сравнивали с ритуксимабом, анти-CD20 антителом при 8 мг/кг, 5Х/неделю (в.б.) и CD19хCD3 BiTE при 0,5 мг/кг, 5Х/неделю (в.в.). (В отношении CD19хCD3 BiTE смотрите Nagorsen D, et al. Pharmacol Ther. 2012 Dec;136(3):334-42, 2012). Каждое вводили после имплантации опухоли. Данные выражали в виде среднего (СПС) и проводили анализ ANOVA. Ab1, которое дозировали 2х в неделю в.б., было сравнимо с эффективностью CD19хCD3 BiTE, которое дозировали 5х/неделю в.в., в этой *in vivo* модели.

На фиг. 24 проиллюстрировано исследование объема опухоли (в мм³) у мышей NSG, которым подкожно имплантировали смесь Raji/МКПК, аналогично с фиг. 23, при этом анализ ANOVA проводили для AB1, контрольного Ab 6, ритуксимаба и базового контрольного раствора. Ab 1, которое дозировали 2х в

неделю, превосходило терапию ритуксимабом (дозированным при 8 мг/кг; 5х/неделю в.б.) в подавлении развившихся опухолей Raji.

На фиг. 25А и 25В проиллюстрировано замедление роста опухоли, когда лечение начинали одновременно или после трансплантации опухоли hCD20/B16F10.9 гуманизированным мышам, обрабатываемым CD3хCD20 биспецифическим антителом. Фиг. 25А: мышам hCD3 подкожно имплантировали hCD20-трансдуцированные клетки меланомы B16F10.9 и одновременно обрабатывали 0,004 мг/кг или 0,4 мг/кг Антитела 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело) или 4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или базовым контрольным раствором (в.б., 2 раза в неделю). Фиг. 25В: мышам hCD3 подкожно имплантировали клетки меланомы hCD20/B16F10.9, а развившиеся опухоли обрабатывали на 10 день и далее Антителом 1 (CD3хCD20-химерный Fc антитело) или контролем. Мышей дважды в неделю в.б. обрабатывали 0,4 или 4 мг/кг Ab1 или 0,4 мг/кг контрольного Ab5 (анти-FelD1 Ab), или базовым контрольным раствором.

Подробное описание изобретения

Перед тем, как будет описано настоящее изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, так как эти способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют значения, обычно подразумеваемые специалистом в области техники, к которой принадлежит изобретение. В контексте данного документа термин "около", применяемый в отношении конкретного приведенного числового значения, означает, что значение может отклоняться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте данного документа выражение "около 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя для практической реализации или проверки настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

В контексте данного документа выражение "CD3" относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках как часть мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (ТКР) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образуемого при ассоциации двух из четырех рецепторных цепей: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. Подразумевается, что в данном документе все отсылки к белкам, полипептидам и белковым фрагментам относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если четко не указано, что они имеют нечеловеческое происхождение. Таким образом, выражение "CD3" означает человеческий CD3, если не указано, что он имеет нечеловеческое происхождение, например "мышиний CD3", "обезьяний CD3" и т.д.

В контексте данного документа "антитело, которое связывает CD3" или "анти-CD3 антитело" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну из единиц CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или экспрессируемый на клеточной поверхности CD3. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также рекомбинантные варианты белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные CD3-конструкции, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые каким-либо другим образом не связаны с клеточной мембраной.

В контексте данного документа выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" означает один или более белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* так, что по меньшей мере часть белка CD3 находится на внеклеточной стороне клеточной мембраны и является доступной для антигенсвязывающей части антитела.

"Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" включает белки CD3, находящиеся в составе функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется одна, без других типов цепей CD3, на поверхности клетки. "Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. В альтернативном варианте "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий CD3 на своей поверхности, но была искусственным образом сконструирована для экспрессии

CD3 на своей поверхности.

В контексте данного документа выражение "анти-CD3 антитело" включает моновалентные антитела с единичной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD3, и второе плечо, которое связывает второй антиген-(мишень), причем анти-CD3 плечо содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в данном документе в табл. 1 или 2.

Примеры биспецифических анти-CD3 антител описаны в другом месте данного документа. Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела. Типовые анти-CD3 антитела описаны также в US 2007/0280945A1; и международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа термин "CD20" относится к человеческому белку CD20, если не указано, что он имеет нечеловеческое происхождение (например, "мышинный CD20", обезьяний "CD20" и т.д.). Белок человеческого CD20 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую стандартной последовательности NCBI NP_690605.1.

В контексте данного документа выражение "анти-CD20 антитело" включает моновалентные антитела с единичной специфичностью, такие как Ритуксан (ритуксимаб), описанный в патенте США 7879984. Типовые анти-CD20 антитела также описаны в патенте США 7879984 и международной заявке согласно PCT № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

"Опухолевый антиген-мишень" относится к антигену-мишени, экспрессируемому опухолевыми клетками, при этом он может экспрессироваться когнатной клеткой (или здоровыми клетками) перед трансформацией в опухоль. "Опухолеспецифичный антиген" относится к антигену, который экспрессируется или присутствует в опухолевой клетке, но обычно не присутствует в здоровой клетке или клетках другого происхождения.

В контексте данного документа термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащую по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, связанные друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). V_H - и V_L -области можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разделенные более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, выстроенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных вариантах реализации изобретения FR анти-CD3 антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основании параллельного анализа двух или более CDR.

В контексте данного документа термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. В контексте данного документа термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.д. включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с помощью любых подходящих стандартных методов, таких как методы протеолитического расщепления или рекомбинантной генетической инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, чтобы упорядочить один или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или чтобы внести кодоны, создать цистеиновые остатки, модифицировать, добавить или удалить аминокислоты и т.д.

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, которые имитируют гипervарибельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (SMIP) и акули варибельные домены IgNAR, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент" в контексте данного документа.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один варибельный домен. Варибельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и в общем случае содержит по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, в которых домен V_H связан с доменом V_L , домены V_H и V_L могут находиться в любом подходящем расположении относительно друг друга. Например, варибельная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один варибельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним доменом константного фрагмента (Fc) или каким-либо другим образом связанный с Fc-доменом. Неограничивающие типовые конфигурации варибельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 -шарнирная область- C_H2 - C_H3 ; (ii) V_H -шарнирная область- C_H2 - C_H3 ; (iii) V_H - C_L ; (iv) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (v) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (vi) V_L - C_L . В любой конфигурации варибельных и константных доменов, включая любую из вышеприведенных типовых конфигураций, варибельные и константные домены могут быть как напрямую связаны друг с другом, так и могут быть соединены (связаны) полной или частичной химерной шарнирной областью согласно изобретению или полной или частичной C_H1 -областью и химерной шарнирной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из аминокислот верхней и нижней шарнирной области, что приводит к образованию гибкого или полугибкого соединения между смежными варибельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций варибельных и константных доменов, приведенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидных связей).

Мультиспецифический формат антител согласно изобретению, включая типовые раскрытые в данном документе биспецифические форматы антител, как правило, содержит по меньшей мере два разных варибельных домена, причем каждый варибельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном. Мультиспецифические форматы можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с помощью обычных методов, известных в данной области техники.

Антитела согласно настоящему изобретению модифицированы так, чтобы иметь сниженную или отсутствующую комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) согласно проводимым *in vitro* измерениям. "Комплементзависимая цитотоксичность" (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом согласно изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым приводят к лизису клетки-мишени. Измерение КЗЦ и АЗКЦ можно проводить, используя методы анализа, которые хорошо известны и доступны в данной области техники. (Смотрите, например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 652-656). Константная область тяжелой цепи (CH) антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Следовательно, CH антитела можно выбирать на основании необходимости того, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В определенных вариантах реализации изобретения биспецифические антитела согласно изобретению являются человеческими антителами. В контексте данного документа термин "человеческое антитело" включает антитела с варибельными и константными областями, полученными из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные методом случайного или сайт-

специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. При этом в контексте данного документа термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были привиты в человеческие каркасные последовательности.

Антитела согласно изобретению могут в некоторых вариантах реализации, представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. В контексте данного документа подразумевается, что термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), являющегося трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина (смотрите, например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют любыми другими методами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Однако в определенных вариантах реализации изобретения рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животного, трансгенного в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из и родственны последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не существовать в природе в репертуаре антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно в 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелых цепей. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, а молекула около 75-80 кДа состоит из ковалентно сопряженных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы очень тяжело разделить даже после аффинной очистки.

Частота проявления второй формы в различных изотипах интактного IgG связана, без ограничений, со структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области человеческого IgG4 может значительно снизить проявление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых в случае шарнирной области человеческого IgG1. Настоящее изобретение включает антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнирной области, которые могут, например, при выработке, улучшать выход желаемой формы антитела.

Антитела согласно изобретению могут быть выделенными антителами. В контексте данного документа "выделенное антитело" означает антитело, которое было выявлено и сепарировано и/или отделено по меньшей мере от одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, которое было сепарировано или отделено по меньшей мере от одного компонента организма или от ткани или клетки, в которой антитело обычно присутствует или естественным образом вырабатывается, является «выделенным антителом» в целях настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения выделенное антитело может быть в значительной степени свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Анти-CD3 или анти-CD20 переменные области, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок 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 антитела. Такие мутации легко можно установить путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из открытых баз данных по последовательностям антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой раскрытой в данном документе аминокислотной последовательности, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий(ие) остаток(ки) другой человеческой последовательности зародышевой линии, или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (в данном документе такие изменения в последовательностях все вместе называются "мутациями зародышевой линии"). Начиная с раскрытых в данном документе последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, специалист в данной области техники легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индиви-

дуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения все каркасные остатки и/или остатки CDR в пределах доменов V_H и/или V_L мутированы обратно на остатки, присутствующие в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах реализации изобретения только определенные остатки мутированы обратно на остатки исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы на соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е., последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально получено антитело). Кроме того, антитела согласно изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, когда некоторые индивидуальные остатки мутированы на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, легко можно исследовать в отношении одного или более желаемого свойства, такого как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает анти-CD3 или анти-CD20 переменные области, содержащие варианты любых раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает анти-CD3 антитела, 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 по сравнению с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, приведенными в табл. 1.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в переменной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками на антигене и могут иметь разное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно объединенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образуется смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных условиях эпитоп на антигене может содержать компоненты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы.

Термин "значительная степень идентичности" или "в значительной степени идентичный", применимый к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований при определении с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, которые обсуждаются ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную степень идентичности со стандартной молекулой нуклеиновой кислоты может, в определенных случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или в значительной степени сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый стандартной молекулой нуклеиновой кислоты.

При применении к полипептидам термин "значительное сходство" или "в значительной степени сходный" означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, таком, которое обеспечивают программы GAP или BESTFIT с использованием штрафов за гэпы по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательностей, и даже более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичности последовательностей. Предпочтительно позиции неидентичных остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" - это такая замена, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем случае консервативная аминокислотная замена не приводит к значительным изменениям функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности или степень сходства можно скорректировать в большую сторону, чтобы учесть консервативную природу замены. Средства для проведения такой корректировки хорошо известны специалистам в дан-

ной области техники. Смотрите, например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатическо-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи имеют цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативное замещение представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативное замещение" представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, как правило, определяют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для белкового анализа противопоставляет сходные последовательности, используя оценки сходства, приписанные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с установленными по умолчанию параметрами, чтобы определить гомологию последовательностей или идентичность последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. Смотрите, например, GCG версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA, используя установленные по умолчанию или рекомендуемые параметры; программа в GCG версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение процента идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN с установленными по умолчанию параметрами. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы

Антитела согласно изобретению могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного полипептида-мишени. Смотрите, например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22: 238-244. Анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связано (например, посредством химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или каким-либо другим образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифического или мультиспецифического антитела с дополнительной специфичностью связывания.

Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий CD3, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении антигена-мишени. Антиген-мишень, который связывает другое плечо биспецифического антитела к CD3, может представлять собой любой антиген, экспрессируемый на или вблизи клетки, ткани, органа, микроорганизма или вируса, против которых необходим направленный иммунный ответ. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в табл. 1.

В контексте биспецифических антител согласно настоящему изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень, антиген-мишень может представлять собой опухолеассоциированный антиген. Неограничивающие примеры опухолеассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, BIRC5 (сурвивин), BIRC7, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, угольную ангидразу IX, каспазу-8, CALR, CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Mucl, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3,

Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, антиген Thompson-nouvelle (Tn), TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

В контексте биспецифических антител согласно настоящему изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень, антиген-мишень может представлять собой ассоциированный с инфекционным заболеванием антиген. Неограничивающие примеры ассоциированных с инфекционным заболеванием антигенов включают, например, антиген, который экспрессируется на поверхности вирусной частицы или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной вирусом, при этом вирус выбран из группы, состоящей из ВИЧ, гепатита (А, В или С), вируса герпеса (например, ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВГА-6, ВЗВ, вируса Эпштейна-Барр), аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторного синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса коревой краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, вирус Т клеточной лейкемии человека (HTLV), вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингема и вируса арбовирусного энцефалита. В альтернативном варианте антиген-мишень может представлять собой антиген, который экспрессируется на поверхности бактерии или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной бактерией, при этом бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидий, риккетсий, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков, гонококков, клебсиелл, протеуса, серратий, псевдомонад, легионелл, дифтерий, сальмонелл, бацилл, холеры, тетануса, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспир и бактерий, вызывающих болезнь Лайма. В определенных вариантах реализации изобретения антиген-мишень представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности грибка или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной грибом, при этом грибок выбран из группы, состоящей из *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus* и т.д.), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В определенных вариантах реализации изобретения представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности паразита или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной паразитом, при этом паразит выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps* и *Brugia malayi*.

Неограничивающие примеры конкретных патоген-ассоциированных антигенов включают, например, gp120 ВИЧ, CD4 ВИЧ, гликопротеин L гепатита В, гликопротеин М гепатита В, гликопротеин S гепатита В, E1 гепатита С, E2 гепатита С, гепатоцит-специфический белок, gB вируса простого герпеса, gB цитомегаловируса и оболочечный белок HTLV.

В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и CD20. Такие молекулы могут называться в данном документе, например, "анти-CD3/анти-CD20" или "анти-CD3/CD20", или "анти-CD3хCD20", или "CD3хCD20" биспецифическими молекулами, или другими сходными терминами.

В контексте данного документа выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарность области (CDR), которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфически связывается с конкретным антигеном. В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела в том смысле, в котором эти термины были определены в другом месте данного документа.

В контексте данного документа выражение "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отличный антиген (например, CD20).

В определенных типовых вариантах реализации настоящего изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVR) и вариабельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифического антитела) CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены приставкой "A1", а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены приставкой "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; а CDR второго антиген-

связывающего домена могут называться A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямым или непрямым образом связаны друг с другом и образовывать биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению (т.е. биспецифический ScFv), дополнительно связанную с Fc-доменом. В альтернативном варианте первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут каждый быть связанным с отдельным Fc-доменом. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат два Fc-домена, каждый из которых представляет собой индивидуальную часть отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй Fc-домены могут иметь одинаковую последовательность, за исключением наличия мутации в домене C_H3, предназначенной для упрощения или облегчения очистки гетеродимерных (т.е. биспецифических) молекул.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый C_H3-домен и второй C_H3-домен Ig, при этом первый и второй C_H3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, а по меньшей мере одно аминокислотное отличие снижает связывание биспецифического антитела с протеином А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотное отличие. В одном варианте реализации изобретения первый C_H3-домен Ig связывает протеин А, а второй C_H3-домен Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание протеина А, такую как модификация H435R (согласно нумерации EU; H95R согласно нумерации экзонов IMGT). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y436F (согласно нумерации EU; Y96F согласно IMGT). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать во втором C_H3, включают: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I согласно IMGT) в случае C_H3-доменов IgG1; и Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I согласно IMGT) в случае C_H3-доменов IgG4.

Можно применять другие форматы или технологии биспецифических антител, чтобы получить антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению. Например, антитело или его фрагмент, характеризующееся специфичностью связывания первого антигена, можно функционально связать (например, посредством химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или каким-либо другим образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, характеризующееся специфичностью связывания второго антигена, чтобы получить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Конкретные типовые биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничений, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, продукты слияния IgG-scFv, Ig с двойным переменным доменом (DVD), квадруму, выступ-во-впадину, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-во-впадину и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую молнию, дуотело, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAb 4:6, 1-11 и приведенные в ней ссылки в отношении обзора вышеуказанных форматов).

В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению Fc-домены могут содержать одно или более аминокислотных изменений (например, вставок, делеций или замен) по сравнению с конкретной химерной версией Fc-домена без изменения желаемой функциональности. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, которая приводит к получению модифицированного Fc-домена с модифицированным взаимодействием связывания (например, усиленным или ослабленным) между Fc и FcRn. В одном варианте реализации изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, причем модификация повышает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH соответствует диапазону от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в позиции 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте реализации изобретения 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).

Варианты последовательностей

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок 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 легко можно установить путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из открытых баз данных по последовательностям антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получены из любой раскрытой в данном документе типовой аминокислотной последовательности, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы на соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий(ие) остаток(ки) другой человеческой последовательности зародышевой линии, или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения в последовательностях все вместе называются "мутациями зародышевой линии"). Начиная с раскрытых в данном документе последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепи, специалист в данной области техники легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения все каркасные остатки и/или остатки CDR в пределах доменов V_H и/или V_L мутированы обратно на остатки, присутствующие в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах реализации изобретения только определенные остатки мутированы обратно на остатки исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы на соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально 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, когда некоторые индивидуальные остатки мутированы на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающих доменов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, легко можно исследовать в отношении одного или более желаемого свойства, такого как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженная иммуногенность и т.д. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любых раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или более консервативными заменами. 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 по сравнению с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытыми в данном документе. "Консервативная аминокислотная замена" - это такая замена, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем случае консервативная аминокислотная замена не приводит к значительным изменениям функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают:

- (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- (2) алифатическо-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;
- (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин;
- (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;
- (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;
- (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и
- (7) серосодержащие боковые цепи имеют цистеин и метионин.

Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативное замещение представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. "Умеренно консервативное замещение" представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью после-

довательностей, можно определять с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для белкового анализа противопоставляет сходные последовательности, используя оценки сходства, приписанные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с установленными по умолчанию параметрами, чтобы определить гомологию последовательностей или идентичность 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, используя установленные по умолчанию или рекомендуемые параметры; программа в GCG версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение процента идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN с установленными по умолчанию параметрами. 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

Настоящее изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, анти-CD3 антитело согласно настоящему изобретению может проявлять сниженное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В альтернативном варианте анти-CD3 антитела согласно изобретению могут проявлять повышенное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH, составляющие менее чем около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. В контексте данного документа выражение "нейтральный pH" означает pH, составляющий от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH, составляющие около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В определенных случаях "сниженное связывание ... при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" выражают в терминах соотношения значения K_d связывания антитела со своим антигеном при кислом pH со значением K_d связывания антитела со своим антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может считаться проявляющим "сниженное связывание с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" в целях настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует соотношение кислой/нейтральной K_d , составляющее 3,0 или более. В определенных типовых вариантах реализации изобретения соотношение кислой/нейтральной K_d для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получать, например, проводя скрининг популяции антител в отношении сниженного (или повышенного) связывания с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут привести к получению антител с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело со сниженным связыванием антигена при кислом pH по сравнению с нейтральным pH можно получить путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина.

Связывание Fc-рецептора

Предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы и антитела согласно изобретению, содержащие химерный Fc-домен, такой как шарнирная область-CH2-CH3 константный домен тяжелой цепи Ig, полученный из различных изотипов IgG и имеющий уникальные характеристики в отношении связывания и активации Fc-рецептора. Определенные Fc-домены согласно изобретению сконструированы так, чтобы содержать химерную шарнирную область.

В контексте данного документа термин "химерный" означает состоящий из частей разного происхождения. Выражение "химерный белок" включает первый аминокислотный белок, связанный со вторым аминокислотным белком, с которым он обычно не связан в природе. Аминокислотные последовательности могут обычно существовать в виде отдельных белков или в разном упорядочении в одном белке и быть соединены в слитом полипептиде в новом упорядочении. Химерные белки можно создавать различными известными в данной области техники способами, например, путем химического синтеза или путем создания полинуклеотида, который кодирует аминокислоты химерного белка в желаемом упорядочении. Типовые химерные белки включают химерные последовательности шарнирной области, соединяющие домены тяжелой цепи IgG, и слитые белки, сконструированные так, чтобы получились человеческие антитела и антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению.

Раскрытые в данном документе химерные белки были сконструированы так, чтобы минимизировать образование иммуногенных эпитопов в соединениях, например, по сравнению с Fc-областью или

доменом IgG дикого типа. Следовательно, сконструированные белки согласно изобретению имеют сниженную иммуногенность и демонстрируют сниженное связывание с Fc-рецепторами, а также сниженные или отсутствующие эффекторные функции.

В контексте данного документа подразумевается, что термин "шарнирная область" включает область последовательных аминокислотных остатков, которые соединяют С-конец домена C_H1 с N-концом домена C_H2 иммуноглобулина. Несколько аминокислот N-конца домена C_H2, которые кодируются экзоном C_H2, также считаются частью "нижней шарнирной области". Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, аминокислоты шарнирной области IgG1, IgG2 и IgG4 были охарактеризованы как содержащие 12-15 последовательных аминокислот, кодируемых отдельным шарнирным экзоном, и несколько N-концевых аминокислот домена C_H2 (кодируемых экзоном C_H2) (Brekke, O.H., et al. *Immunology Today* 16(2):85-90 (1995)). С другой стороны, IgG3 содержит шарнирную область, состоящую из четырех сегментов: одного верхнего сегмента, напоминающего шарнирную область IgG1, и 3 сегментов, идентичных аминокислотным повторам, характерным для IgG3.

В контексте данного документа подразумевается, что термин "химерная шарнирная область" включает химерный белок, содержащий первую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области одной молекулы Ig, и вторую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области молекулы Ig другого класса или подкласса. Типовые химерные шарнирные области согласно настоящему изобретению содержат первую аминокислотную последовательность или последовательность "верхней шарнирной области", полученную из шарнирной области человеческого IgG1 или шарнирной области человеческого IgG4, и вторую аминокислотную последовательность или последовательность "нижней шарнирной области", полученную из шарнирной области человеческого IgG2. В определенных вариантах реализации изобретения первая последовательность или последовательность "верхней шарнирной области" содержит аминокислотные остатки в позициях от 216 до 227 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая последовательность или последовательность "нижней шарнирной области" содержит аминокислотные остатки в позициях от 228 до 236 в соответствии с нумерацией EU.

В целях данного изобретения подразумевается, что "верхняя шарнирная область" содержит аминокислотные остатки в позициях от 216 до 227 в соответствии с нумерацией EU (аминокислотные остатки в позициях от 226 до 240 в соответствии с нумерацией Кабата) (смотрите фиг. 1). Подразумевается, что "нижняя шарнирная область" содержит аминокислотные остатки в позициях от 228 до 236 в соответствии с нумерацией EU (аминокислотные остатки в позициях от 241 до 249 в соответствии с нумерацией Кабата) (смотрите фиг. 1).

В настоящем документе для удобства специалиста, реализующего изобретение, аминокислотные остатки шарнирной области для человеческого IgG1, IgG2 и IgG4 были определены по системе нумерации EU Кабата (Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)), также известной как "нумерация EU" или "индекс EU", обновленной в соответствии с IMGT® Scientific Chart, IMGT®, международной иммуногенетической информационным системой®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, созданный: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.

Соответствие между нумерацией EU для шарнирных аминокислот человеческого IgG1, IgG2 и IgG4 и системами уникальной нумерации доменов IMGT, нумерации экзонов IMGT и нумерации Кабата (также смотрите Kabat, E.A. et al., 1991, выше) описаны в табл. A-F ниже:

Таблица А. Нумерация шарнирной области IgG1

Аминокислоты IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Уникальная нумерация для ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ IMGT ^a	Нумераци я экзонов IMGT ^a	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
P	2	2	217	227
K	3	3	218	228
S	4	4	219	232 ^a [229] ^b
C	5	5	220	233 ^a [230] ^b
D	6	6	221	234 ^a [232] ^b
K	7	7	222	235
T	8	8	223	236
H	9	9	224	237
T	10	10	225	238
C	11	11	226	239
P	12	12	227	240
P	13	13	228	241
C	14	14	229	242
P	15	15	230	243

Таблица В. Нумерация шарнирной области С-домена IgG1

Аминокислоты IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Уникальная нумерация для С- доменов IMGT ^a	Нумераци я экзонов IMGT ^a	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	1.6	1	231	244
P	1.5	2	232	245
E	1.4	3	233	246
L	1.3	4	234	247
L	1.2	5	235	248
G	1.1	6	236	249

Таблица С. Нумерация шарнирной области IgG2

Аминокислоты IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Уникальная нумерация для ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ IMGT ^a	Нумераци я экзонов IMGT ^a	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
R	2	2	217	227
K	3	3	218	228
C	4	4	219 ^a (221) ^b	232
C	5	5	220 ^a (-) ^b	233
V	6	6	222	235
E	7	7	224	237
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
P	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

Таблица D. Нумерация шарнирной области С-домена IgG2

Аминокислоты IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	231	244
P	232	245
P	233	246
V	234	247
A	235	248
--	236	249

Таблица Е. Нумерация шарнирной области IgG4

Аминокислоты IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Уникальная нумерация для ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ IMGT ^a	Нумерация экзонов IMGT ^a	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(E)	1	1	216	226
S	2	2	217	227
K	3	3	218	228
Y	4	4	– ^a (219) ^b	229
G	5	5	– ^a (220) ^b	230
F	6	6	224	237
P	7	7	225	238
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
S	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

Таблица F. Нумерация шарнирной области C-домена IgG4

Аминокислоты IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Нумерация EU	Нумерация Кабата
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
F	234	247
L	235	248
G	236	249

Аминокислоты, полученные посредством сплайсинга экзонов, указаны в скобках.

– означает отсутствие соответствующего номера

-- означает отсутствие соответствующей аминокислоты в этой позиции

^a нумерация в соответствии с последним обновлением IMGT Scientific Chart

^b нумерация в соответствии с индексом EU, приведенная в Kabat, EA, et al. 1991

Также см., например, Lefranc, M.-P. et al., Devel Comp Immunol, 29, 185-203 (2005); и Edelman, G.M. et al. PNAS USA, 63:78-85 (1969).

Термин "связывание" в контексте связывания антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка, например, с заданным антигеном или с FcγR, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации минимум между двумя компонентами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген или Fc-содержащий белок и FcγR.

Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_d около 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее при определении методом, например, поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на инструменте BIAcore 3000 с применением антигена или FcR в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве анализата (или антилиганда). Соответственно, антитело или другой связывающий белок связывается с заданным антигеном или рецептором с аффинностью, соответствующей величине K_d , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его аффинность в отношении связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином).

В контексте данного документа термин " K_d " (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе диссоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Существует обратная взаимозависимость между K_d и аффинностью связывания, следовательно, чем меньше величина K_d , тем выше (т.е. сильнее) аффинность. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к высокой способности формировать взаимодействие и, следовательно, меньшей величине K_d , и наоборот, термины "более низкая аффинность" или "более слабая" аффинность относятся к более низкой способности формировать взаимодействие и, следовательно, большей величине K_d . В некоторых случаях более высокую аффинность связывания (или K_d) конкретной молекулы (например, антитела) со связанной с ней партнерской молекулой (например, рецептором X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой связанной с ней партнерской молекулой (например, рецептором Y) можно выразить в виде соотношения связывания, определяемого делением большей величины K_d (более низкой или более слабой аффинности) на меньшую K_d (более высокую или более сильную аффинность), например, выражая в виде 5-кратно или 10-кратно большей аффинности в зависимости от обстоятельств.

В контексте данного документа термин " k_d " (s^{-1} или l/s) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости диссоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Указанная величина также называется величиной $k_{дисс}$.

В контексте данного документа термин " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ или l/M) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR.

В контексте данного документа термин " k_A " (M^{-1} или l/M) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе ассоциации антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с FcγR. Равновесную константу ассоциации получают путем деления k_a на k_d .

В контексте данного документа термин " EC_{50} " или " EC_{50} " относится к полумаксимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая индуцирует ответ посередине между базовой линией и максимумом через определенное время воздействия. EC_{50} главным образом представляет концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального действия. Таким образом, сниженное связывание наблюдается при повышенной EC_{50} или величине полумаксимальной эффективной концентрации.

В одном варианте реализации изобретения сниженное связывание может быть определено как повышенная концентрация EC_{50} антитела, которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

В некоторых вариантах реализации изобретения сниженная цитотоксическая активность, такая как АЗКЦ или КЗЦ, может быть определена как повышенная концентрация EC_{50} антитела, которая обеспечивает лизис полумаксимального количества клеток-мишеней. Цитотоксичность также определяют в виде процента цитотоксичности или процента лизиса, который представляет собой долю от общей популяции клеток, определяемых как лизированные в анализе высвобождения кальцеина или эквивалентном анализе. Процент цитотоксичности можно определить так, как описано в примере 6.

В других вариантах реализации изобретения сниженная пролиферация может быть определена как повышенная концентрация EC_{50} антитела, которая обеспечивает пролиферацию полумаксимального количества клеток-мишеней.

В контексте данного документа подразумевается, что выражение "эффекторные функции" включает функциональные способности, обеспечиваемые Fc-содержащим белком после связывания FcγR. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, можно сказать, что образование комплекса Fc/FcγR задействует большое количество эффекторных клеток в участках связанного антигена, что, как правило, приводит к разнообразным сигнальным событиям внутри клеток и важным последующим иммунным ответам.

Химерные Fc-содержащие антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению проявляют измененные или сниженные эффекторные функции по сравнению с соответствующими Fc-содержащими антигенсвязывающими белками или антителами дикого типа. См., например, публикацию согласно РСТ № WO 2014/121087, опубликованную 7 августа 2014 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения измененная или сниженная эффекторная функция представляет собой цитотоксическую эффекторную функцию, например, цитотоксичность, комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антителозависимую цитотоксичность (АЗКЦ). В одном варианте реализации изобретения измененная или сниженная эффекторная функция представляет собой комплементзависимую цитотоксичность. В другом варианте реализации изобретения измененная или сниженная эффекторная функция представляет собой антителозависимую цитотоксичность. В других вариантах реализации изобретения измененная или сниженная эффекторная функция представляет собой клеточную пролиферацию клеток-мишеней.

Несколько эффекторных функций антител опосредуются, по меньшей мере частично, Fc-рецепторами (FcR), которые связывают Fc-область антитела в константном домене (в частности, домене CH2 и CH3) типового иммуноглобулина. Существует большое количество Fc-рецепторов, которые специфичны в отношении разных классов иммуноглобулинов, т.е. IgG, IgE, IgA, IgM и IgD. Семейство Fc-рецепторов человеческого IgG делится на три группы: FcγRI (CD64), который способен связывать IgG с высокой аффинностью, FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), которые оба являются низоаффинными рецепторами. Каждый подкласс FcγR кодируется двумя или тремя генами, а альтернативный сплайсинг РНК приводит к образованию множества транскриптов, и, следовательно, существует большое разнообразие изоформ FcγR (например, FcγRIA (CD64; FCGR1A), FcγRIB (CD64; FCGR1B), FcγRIIA (CD32A; FCGR2A), FcγRIIB (CD32B; FCGR2B), FcγRIIC (CD32C; FCGR2C), FcγRIIIA (CD16a; FCGR3A) и FcγRIIIB (CD16b; FCGR3B)). Кроме того, FcRn или неонатальный Fc-рецептор (также известный как переносчик Fc-рецепторов, альфа, или FCGRT) способен переносить антитела IgG из материнского организма в плод через плаценту. Кроме того, Fc-рецепторы экспрессируются на большом количестве клеток, включая, например, В-клетки, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и некоторые лимфоциты. На-

пример, клетки U937 человеческой клеточной линии моноцитов экспрессируют как FcγRI, так и FcγRIIA (см., например, Jones, et al. J Immunol 135(5):3348-53 (1985); и Brooks, et al. J Exp Med 170:1369-85 (October 1989)). Каждый упоминаемый в данном документе рецептор включает любую известную функциональную форму рецептора, включая транскрипт-варианты, изоформы и полиморфизмы.

Связывание Fc Ig со своим рецептором приводит эти эффекторные клетки к участкам связывания антигена, что в конечном итоге приводит к разнообразным сигнальным и иммунным ответам, включая активацию В-клеток, воспалительные ответы, цитотоксические ответы и фагоцитарные ответы. Следовательно, сниженное или измененное связывание Fc Ig со своим рецептором может привести к снижению эффекторных функций.

Выражение "антителозависимый клеточный фагоцитоз" или "АЗКФ" относится к эффекторной функции, которая уничтожает (или убивает) клетку-мишень путем поглощения клетки-мишени, а не индукции цитолиза. АЗКФ может являться важным *in vivo* механизмом уничтожения опухолевых клеток. АЗКФ можно определить методами двухцветной флуоресцентной проточной цитометрии, например, методами с применением, например, РКН2 (зеленого флуоресцентного красителя) и конъюгированных с фикоэритрином (красным) моноклональных антител против разных белков клеточной поверхности для разделения исследуемых клеток, определяя, таким образом, фагоцитарную активность и скорость фагоцитоза. Измерения АЗКФ хорошо известны в данной области техники. Терапевтические стратегии, которые избирательно активируют FcγRIIA по сравнению с FcγRIIb, могут усиливать фагоцитарную активность макрофагов (Richards, JO, et al. 2008 Mol Cancer Ther 7(8):2517-27). Химерные Fc-содержащие антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению связывают и активируют человеческий FcγRIIA. В определенных случаях антигенсвязывающие белки и антитела согласно изобретению связывают человеческий FcγRIIA с большей аффинностью, чем эти антитела связывают FcγRIIb. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует аффинность связывания К_д в отношении человеческого FcγRIIA, более чем в 5 раз превышающую аффинность связывания К_д в отношении человеческого FcγRIIb. В других вариантах реализации изобретения антитело демонстрирует аффинность связывания К_д в отношении человеческого FcγRIIA, более чем в около 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз превышающую аффинность связывания К_д в отношении человеческого FcγRIIb.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул

Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 и CD20. Например, настоящее изобретение включает анти-CD3хCD20 антитела, которые связывают клетки Jurkat (CD3+) и клетки Raji (CD20+) со значением EC₅₀ менее чем около 60 нМ, согласно данным *in vitro* анализа связывания, например, формата анализа, описанного в Примере 3 данного документа (например, оценки связывания клеток Jurkat или клеток Raji с CD3хCD20 антителами), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают CD3 или CD20 на поверхности клетки (например, клетки Jurkat и/или клетки Raji) со значением EC₅₀, составляющим менее чем около 75 нМ, менее чем около 70 нМ, менее чем около 65 нМ, менее чем около 60 нМ, менее чем около 50 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 30 нМ или менее чем около 25 нМ, согласно данным *in vitro* анализа связывания, например, формата анализа, описанного в примере 4 данного документа, или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые способны одновременно связываться с человеческим CD3 и человеческим CD20. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению специфически взаимодействуют с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или CD20. Степень, в которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD3 и/или CD20, можно оценить с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 4 данного документа. Например, настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают человеческие Т-клеточные линии, которые экспрессируют CD3 (например, Jurkat), человеческие В-клеточные линии, которые экспрессируют CD20 (например, Raji), и Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови [МКПК] яванского макака).

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любые из вышеуказанных клеток и клеточных линий со значением EC₅₀ от около 8,74 × 10⁻⁶ до около 5,99 × 10⁻⁸ или менее согласно данным анализа FACS, описанного в примере 4, или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение включает биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также включает биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 с умеренной или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных необходимых нацеливающих свойств. Например, в контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень (например,

CD20), может быть желательным, чтобы плечо, связывающее антиген-мишень, связывало антиген-мишень с высокой аффинностью, тогда как анти-CD3 плечо связывает CD3 с умеренной или низкой аффинностью. Таким образом можно достичь преимущественного нацеливания антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, в то же время избегая общего/ненацеленного связывания CD3 и связанных с этим последующих неблагоприятных побочных эффектов.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3 и индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. Например, настоящее изобретение включает анти-CD3хCD20 антитела, которые индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток с EC₅₀ меньше чем около 60 пМ согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, формата анализа, описанного в примере 5 данного документа (например, оценки степени уничтожения опухолевых клеток Raji человеческими МКПК в присутствии анти-CD3 антител), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток (например, МКПК-опосредованное уничтожение клеток Raji) со значением EC₅₀, составляющим менее чем около 56 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 45 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 35 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 25 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 15 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 5 пМ или менее чем около 1 пМ, согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, формата анализа, описанного в примере 5 данного документа, или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3/CD20 и индуцируют комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), хотя и в меньшей степени, чем антитела, имеющие Fc-домен IgG дикого типа. Например, настоящее изобретение включает анти-CD3хCD20 антитела, которые индуцируют КЗЦ уничтожение клеток Raji или Daudi (CD20-экспрессирующих) с процентом цитотоксичности (%цитотоксичности) менее чем около 50% согласно данным *in vitro* анализа опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток, например, формата анализа, описанного в примере 6 данного документа (например, оценки степени уничтожения клеток-мишеней (Raji или Daudi) в присутствии комплемента и анти-CD3хCD20 антител), или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению индуцируют КЗЦ уничтожение клеток (например, комплемент-опосредованное уничтожение клеток Raji или Daudi) с процентом цитотоксичности, составляющим менее чем около 45%, менее чем около 40%, менее чем около 35%, менее чем около 30%, менее чем около 25%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 1%, меньше фоновой цитотоксичности или с отсутствием выявляемой цитотоксичности, согласно данным *in vitro* анализа комплемент-опосредованного уничтожения клеток, например, формата анализа, описанного в примере 6 данного документа, или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий CD3/CD20 и не индуцируют в значительной степени антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) по сравнению с антителами, имеющими Fc-домен IgG дикого типа.

Например, настоящее изобретение включает анти-CD3хCD20 антитела с не поддающимся оценке уничтожением клеток Raji или Daudi (CD20-экспрессирующих) с процентом цитотоксичности (%цитотоксичности) менее чем около 20% (или меньше фоновой цитотоксичности) согласно данным *in vitro* анализа опосредованного NK-клетками уничтожения клеток, например, формата анализа, описанного в примере 7 данного документа (например, оценки степени уничтожения клеток-мишеней (Raji или Daudi) в присутствии NK-клеток и анти-CD3хCD20 антител), или в значительной степени сходного анализа. В значительной степени сходные методы анализа могут включать присутствие NK-клеток, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов или других FcγRIII-экспрессирующих клеток, включая клетки, экспрессирующие вариантный FcγRIII. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению демонстрируют отсутствие выявляемой активности АЗКЦ (например, опосредованного NK-клетками или FcγRIII уничтожения клеток Raji или Daudi) с процентом цитотоксичности, составляющим менее чем около 30%, менее чем около 25%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 1%, меньше фоновой цитотоксичности или с отсутствием выявляемой цитотоксической активности, согласно данным *in vitro* анализа FcγRIII-опосредованного уничтожения клеток, например, формата анализа, описанного в Примере 7 данного документа, или в значительной степени сходного анализа.

В соответствии с определенными вариантами реализации настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий FcγRIIA (например, при 25°C) с K_d менее чем около 23,5 мкМ согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса.

нанса, например, с применением формата анализа, описанного в Примере 8 данного документа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают FcγRIIA с К_д, составляющей менее чем около 20,5 мкМ, менее чем около 20 мкМ, менее чем около 19,3 мкМ, менее чем около 18 мкМ, менее чем около 17 мкМ, менее чем около 16 мкМ, менее чем около 15 мкМ, менее чем около 10 мкМ, менее чем около 9 мкМ, менее чем около 8 мкМ, менее чем около 7 мкМ, менее чем около 6 мкМ, менее чем около 5 мкМ, менее чем около 4 мкМ, менее чем около 3 мкМ, менее чем около 2 мкМ, менее чем около 1 мкМ, менее чем около 900 нМ, менее чем около 800 нМ или менее чем около 700 нМ, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 8 данного документа (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

В соответствии с определенными вариантами реализации настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают человеческий FcγRIIB (например, при 25°C) с К_д менее чем около 233 мкМ согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 8 данного документа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают FcγRIIB с К_д, составляющей менее чем около 200 мкМ, менее чем около 190 мкМ, менее чем около 180 мкМ, менее чем около 170 мкМ, менее чем около 160 мкМ, менее чем около 150 мкМ, менее чем около 140 мкМ, менее чем около 130 мкМ, менее чем около 125 мкМ, менее чем около 123 мкМ, менее чем около 120 мкМ, менее чем около 110 мкМ, менее чем около 100 мкМ, менее чем около 90 мкМ, менее чем около 80 мкМ, менее чем около 70 мкМ, менее чем около 60 мкМ, менее чем около 50 мкМ или менее чем около 40 мкМ, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, описанного в примере 8 данного документа (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3хCD20 с диссоциативным временем полужизни ($t^{1/2}$), составляющим более чем около 8 суток согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с применением формата анализа, описанного в примере 9 данного документа, или в значительной степени сходного анализа. В определенных вариантах реализации изобретения антитела демонстрируют $t^{1/2}$, составляющее более чем около 5 суток, более чем 6 суток, более чем около 7 суток, более чем около 8 суток, более чем около 9 суток, более чем около 10 суток, более чем около 11 суток, более чем около 12 суток, более чем около 13 суток, более чем около 14 суток, более чем около 15 суток или более чем около 20 суток, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с применением формата анализа, описанного в примере 9 данного документа (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или в значительной степени сходного анализа.

Настоящее изобретение также включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые не проявляют значительной активности в одном или более анализах, выбранных из группы, состоящей из: (a) индукции пролиферации МКПК in vitro; (b) КЗЦ цитотоксичности (смотрите, например, пример 6); (d) АЗКЦ (смотрите, например, пример 7).

Настоящее изобретение также включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют значительную активность в одном или более анализах, выбранных из группы, состоящей из: (a) снижения числа В-клеток (например, В-клеток CD45⁺/CD20⁺) у яванских макаков (см., например, примеры 10 и 11); (b) снижения объема В-клеточной опухоли (например, объема опухоли Raji) в иммунодефицитных мышинных моделях (см., например, пример 12A) и (c) регрессии опухолей в мышинных моделях с развившимися опухолями (см., например, пример 12B).

Настоящее изобретение включает анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые способны снижать число В-клеток у субъекта (смотрите, например, пример 10). Например, в соответствии с определенными вариантами реализации изобретения предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем одно введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе, составляющей около 1, около 0,9, около 0,8 г, около 0,7, около 0,6, около 0,5, около 0,4, около 0,3, около 0,2, около 0,1, около 0,08, около 0,06, около 0,04, около 0,03, около 0,02, около 0,01 мг/кг или менее) приводит к снижению числа В-клеток у субъекта (например, в образце крови, взятом у субъекта) ниже выявляемых уровней. В определенных вариантах реализации изобретения одно введение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе, составляющей около 0,1 мг/кг, приводит к снижению числа В-клеток у субъекта ниже выявляемых уровней приблизительно на 7 сутки, приблизительно на 6 сутки, приблизительно на 5 сутки, приблизительно на 4 сутки, приблизительно на 3 сутки, приблизительно на 2 сутки или приблизительно на 1 сутки после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту. В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения одно введение анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в соответствии с изобретением в дозе, составляющей около 0,01

мг/кг, приводит к тому, что число В-клеток остается ниже выявляемых уровней в течение по меньшей мере приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 суток или более после введения. В контексте данного документа выражение "ниже выявляемых уровней" означает, что в образце крови, взятом у субъекта, невозможно прямым или косвенным образом определить наличие В-клеток с помощью стандартных методов выявления, например, анализа FACS для В-клеточных маркеров, приведенного в примере 10 данного документа.

В альтернативном варианте одну первую дозу вводят в низкой дозировке, такой как 10 или 30, или 100 мкг, а затем через некоторое время вводят вторую дозу в более высокой дозировке, например, в два или три раза превышающей первую дозировку, чтобы предотвратить, уменьшить или смягчить цитокиновую бурю в организме пациента. Под уменьшением "цитокиновой бури" в организме пациента подразумевается уменьшение действия цитокинового каскада или гиперцитокинемии, при этом такая негативная иммунная реакция может быть вызвана, без ограничений, положительной обратной связью между цитокинами и белыми кровяными тельцами и/или сильно повышенными уровнями различных цитокинов.

В соответствии с примером 20 вводят первую (начальную) дозу биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению (например, Ab1), за которой через некоторое время следует вторая доза, причем вторая доза превышает (является большей) первую дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая доза приблизительно в 2 раза превышает или приблизительно в 3 раза превышает первую дозу. В другом варианте реализации изобретения биспецифическую антигенсвязывающую молекулу вводят еженедельно в виде первой дозы в течение последовательных недель, например четырех (4) последовательных недель. В другом варианте реализации изобретения первую дозу вводят еженедельно с последующими месячными дозами в течение дополнительного периода времени (или с определенным числом месячных доз). В некоторых вариантах реализации изобретения после определенного режима дозирования первой дозы вторую дозу вводят еженедельно с последующими месячными дозами в течение дополнительного периода времени. В некоторых вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 10 мкг, а вторая доза составляет 30 мкг. В некоторых вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 30 мкг, а вторая доза составляет 100 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 100 мкг, а вторая доза составляет 300 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 300 мкг, а вторая доза составляет 1000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 1000 мкг, а вторая доза составляет 2000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 2000 мкг, а вторая доза составляет 3000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 3000 мкг, а вторая доза составляет 4000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 4000 мкг, а вторая доза составляет 5000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 5000 мкг, а вторая доза составляет 6000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 6000 мкг, а вторая доза составляет 7000 мкг. В других вариантах реализации изобретения первая (начальная) доза составляет 7000 мкг, а вторая доза составляет 8000 мкг.

В настоящем изобретении также предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые при введении к субъекту приводят не более чем к временному снижению числа Т-клеток. Например, предложены анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые при введении к субъекту в дозе, составляющей около 0,01 или около 0,1 мг/кг, или около 1 мг/кг, приводят к уменьшению числа Т-клеток на 1 сутки после введения, после чего число Т-клеток на микролитр крови восстанавливается (например, приблизительно на 2, 4, 7, 14, 28 сутки или позже после введения). Например, в настоящем изобретении предложена анти-CD3/анти-CD20 биспецифическая антигенсвязывающая молекула, причем число Т-клеток на микролитр крови, взятой у субъекта приблизительно на 4-7 сутки после введения антигенсвязывающей молекулы в дозе, составляющей около 0,01 или около 0,1 мг/кг, или около 1 мг/кг, равно или превышает число Т-клеток на микролитр крови, взятой у субъекта до введения антигенсвязывающей молекулы, определенное с помощью стандартных методов выявления Т-клеток, например, анализа FACS для Т-клеточных маркеров, приведенного в примере 10 данного документа.

Картирование эпитопов и связанные методики

Эпитоп на CD3 или на CD20, 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 CD3. В альтернативном варианте эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или CD20. Антитела согласно изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами из одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма) или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или более разных цепях CD3. В контексте данного документа термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связывать-

ся с разными участками на антигене и могут иметь разное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно объединенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образуется смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных условиях эпитоп на антигене может содержать компоненты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы.

Специалистам в данной области техники известны различные методики, которые можно применять, чтобы определить, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами в полипептиде или белке. Типовые методики включают, например, стандартный анализ перекрестного блокирования, описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ пептидных блотов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно применять такие методы, как исключение эпитопа, удаление эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для определения аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водородно-дейтериевый обмен с масс-спектрометрическим выявлением. В общих словах способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. После этого комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить водородно-дейтериевый обмен во всех остатках за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, выявляя, таким образом, 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. Также в целях картирования эпитопов можно применять рентгеноструктурную кристаллографию комплекса антиген/антитело.

Настоящее изобретение дополнительно включает анти-CD3 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любые из описанных в данном документе конкретных типовых антител (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1). Аналогично, настоящее изобретение также включает анти-CD3 антитела, которые конкурируют за связывание с CD3 с любым из описанных в данном документе конкретных типовых антител (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1).

Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, причем первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, что и конкретные типовые CD3-специфические антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе, и/или второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD20, что и конкретные типовые CD20-специфические антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе.

Аналогично, настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных типовых CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD20 с любым из конкретных типовых CD20-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Можно легко определить, связывается ли антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом или конкурирует ли за связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, используя общепринятые способы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом на CD3 (или CD20), что и стандартная биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекуле дают связаться с белком CD3 (или белком CD20). Далее оценивают возможность связывания исследуемого антитела с молекулой CD3 (или CD20). Если исследуемое антитело может связываться с CD3 (или CD20) после насыщающего связывания со стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно заключить, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом на CD3 (или CD20), чем стандартная биспецифическая антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если исследуемое антитело не может связываться с молекулой CD3 (или CD20) после насыщающего связывания со стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD3 (или CD20), что и эпитоп, связываемый стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулой согласно изобретению. Затем можно проводить дополнительные стандартные эксперименты (например, мутацию пептидов и анализ связывания), чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела в действительности имеет место вследствие

связывания с тем же эпитопом, что и в случае стандартной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, или что за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно проводить с помощью ELISA, RIA, Biosore, 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 (перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99% согласно данным анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В альтернативном варианте считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, снижают или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подгруппа аминокислотных мутаций, которая снижает или устраняет связывание одного антигенсвязывающего белка, снижает или устраняет связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой, вышеописанный эксперимент по связыванию проводят в двух ориентациях: В первой ориентации стандартной антигенсвязывающей молекуле дают связаться с белком CD3 (или белком CD20) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой CD3 (или CD20). Во второй ориентации исследуемому антителу дают связаться с молекулой CD3 (или CD20) в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания стандартной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD3 (или CD20). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD3 (или CD20), можно заключить, что исследуемое антитело и стандартная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD3 (или CD20). Для специалиста в данной области техники очевидно, что антитело, которое конкурирует за связывание со стандартной антигенсвязывающей молекулой, может не обязательно связываться с тем же эпитопом, что и стандартное антитело, но может стерически блокировать связывание стандартного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул

Антигенсвязывающие домены, специфические в отношении конкретных антигенов, можно получать с помощью любой известной в данной области техники методики создания антител. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфических в отношении двух разных антигенов (например, CD3 и CD20), можно должным образом упорядочивать относительно друг друга, чтобы получить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению, используя стандартные методы.

(Обсуждение типовых форматов биспецифических антител, которые можно применять для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению, приведено в другом месте данного документа). В определенных вариантах реализации изобретения один или более индивидуальных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению получены из химерных, гуманизированных и полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более из тяжелой и/или легкой цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению можно получать с помощью технологии VELOCIMMUNE™. При применении технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии создания человеческих антител) сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к конкретному антигену (например, CD3 или CD20), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Получают характеристики антител и проводят отбор в отношении желаемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области замещают желаемой человеческой константной областью, чтобы получить полностью человеческие тяжелые и/или легкие цепи, которые можно вносить в биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

Для создания человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул можно использовать генетически сконструированных животных. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна к перестройке и экспрессии эндогенной мышиной переменной последовательности легкой цепи иммуноглобулина, при этом мышь экспрессирует только один или два человеческих переменных домена легкой цепи, кодируемых последовательностями человеческого иммуноглобулина, функционально связанными с геном мышиной константной области каппа в эндогенном мышином локусе каппа. Такую генетически модифицированную мышь можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, содержащей переменный домен, получен-

ный из одного или более генных сегментов человеческой вариабельной области легкой цепи. (См., например, US 2011/0195454 в отношении подробного обсуждения таких сконструированных мышей и их применения для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул).

Биоэквиваленты

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от типовых раскрытых в данном документе молекул, но сохраняют способность связывать CD3 и/или CD20. Такие варианты молекул могут содержать одну или более добавок, делеций или замен аминокислот при сравнении с родительской последовательностью, но проявлять биологическую активность, которая в значительной степени эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые являются биоэквивалентами любой из типовых антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквивалентные или альтернативные варианты, чья скорость и степень абсорбции не демонстрируют значительной разницы при введении в такой же молярной дозе и в аналогичных условиях, как в виде одной дозы, так и нескольких доз. Некоторые антигенсвязывающие белки считаются эквивалентными или фармацевтически альтернативными, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, но могут считаться биоэквивалентными, так как такая разница в скорости абсорбции является преднамеренной и отображена в мечении, и также не существенна для достижения эффективной концентрации лекарственных препаратов в организме, например, при хроническом применении, и считается несущественной с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствует клинически значимая разница в их безопасности, очистке и эффективности.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или более раз переключаться между стандартным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска возникновения неблагоприятных явлений, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия в отношении соответствующего патологического состояния или состояний в степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и *in vitro* способов. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo* исследование на людях или других млекопитающих, в котором проводят измерение концентрации антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функции от времени; (b) *in vitro* исследование, которое было скоррелировано и является рационально прогностическим для людей в отношении *in vivo* биодоступности; (c) *in vivo* исследование на людях или других млекопитающих, в котором определяют соответствующее кратковременное фармакологическое действие антитела (или его мишени) как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты типовых приведенных в данном документе биспецифических антигенсвязывающих молекул можно конструировать, например, путем создания различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, ненужных для биологической активности. Например, несущественные для биологической активности остатки цистеина можно удалять или замещать другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков после ренатурации. В другом контексте биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты приведенных в данном документе биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые устраняют гликозилирование.

Видовая избирательность и видовая перекрестная реактивность

В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3, но не с CD3 других видов. Также предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD20, но не с CD20 других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3 и с CD3 одного или более отличных от человека видов; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD20 и с CD20 одного или более отличных от человека видов.

В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим CD3 и/или человеческим CD20 и мо-

гут связываться или не связываться, в зависимости от ситуации, с CD3 и/или CD20 одного или более вида из мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макака-резуса или шимпанзе. Например, в конкретном типовом варианте реализации настоящего изобретения предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD20 человека.

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим компонентом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтический препарат, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любые агенты, которые могут наносить вред клетке. Примеры подходящих цитотоксических агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, WO 05/103081).

Терапевтические составы и введение

В контексте данного документа термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству активного терапевтического агента, достаточному для получения желаемого терапевтического ответа без ненужных неблагоприятных побочных явлений, таких как токсичность, раздражение или аллергическая реакция. Точное "эффективное количество", очевидно, будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное патологическое состояние, лечение которого проводят, физическое состояние пациента, тип животного, лечение которого проводят, продолжительность лечения, природа сопутствующей терапии (в случае наличия) и конкретные применяемые составы, а также структура соединений или их производных. В таком случае количество считается терапевтически эффективным, если оно приводит к одному или более, но не ограничивается этим, последствий: (а) ингибированию роста опухоли (например, В-клеточного рака); и (b) угасанию или стабилизации В-клеточного рака.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, условий, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению применяют в терапевтических целях в отношении взрослого пациента, может быть целесообразно внутривенно вводить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению, обычно в виде одной дозы, составляющей от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести патологического состояния можно корректировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять эмпирически; например, можно отслеживать прогресс пациента путем периодического оценивания и соответствующим образом корректировать дозу. Кроме того, можно проводить межвидовое приведение дозровок с помощью хорошо известных в данной области техники способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Известно большое количество различных систем доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются этим, интрадермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальную или слизисто-кожную выстилку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), а также можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки можно применять устройство типа шприц-ручка для доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство типа шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве типа шприц-ручка обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей содержащейся в картридже фармацевтической композиции и опустения картриджа пустой картридж легко можно снять и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство типа шприц-ручка можно использовать повторно. В одноразовом устройстве типа шприц-ручка нет сменного картриджа. Одноразовое устройство типа шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После того, как в резервуаре закончилась фармацевтическая композиция, утилизируют все устройство.

Многочисленные многоразовые устройства для доставки типа шприцов-ручек и автоинжекторов

применяют для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются этим, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMA-LOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), не говоря уже о других. Примеры одноразовых устройств для доставки типа шприцов-ручек, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIK-PEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), не говоря уже о других.

В определенных случаях фармацевтическую композицию можно доставлять с помощью системы для регулируемого высвобождения. В одном варианте реализации изобретения можно применять насос (смотрите Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте реализации изобретения можно применять полимерные материалы; смотрите Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте реализации изобретения систему для регулируемого высвобождения можно размещать вблизи мишени композиции, таким образом, требуется только часть системной дозы (смотрите, например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы для регулируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъецируемые препараты могут включать дозированные лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъецируемые препараты можно готовить общеизвестными способами. Например, инъецируемые препараты можно готовить, например, путем растворения, суспендирования или эмульсифицирования описанного выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно применяемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций можно назвать, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты, и т.д., которые можно применять в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно наполнять подходящую ампулу.

Предпочтительно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения готовят в виде дозированных лекарственных форм в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие дозированные лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (например, ампулы, флаконы), суппозитории и т.д.

Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул

Настоящее изобретение включает способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей анти-CD3 антитело или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает CD3 и антиген-мишень (например, CD20). Терапевтическая композиция может содержать любые раскрытые в данном документе антигена или биспецифические антигенсвязывающие молекулы и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В контексте данного документа выражение "нуждающийся в этом субъект" означает человека или отличное от человека животное, у которого проявляются один или более симптомов или признаков рака (например, субъекта, экспрессирующего опухоль или страдающего от любого из приведенных ниже видов рака), или для которого каким-либо другим образом будет полезно ингибирование или снижение активности CD20 или снижение числа В-клеток CD20+, или регрессия В-клеточных CD20+ опухолей.

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) применимы, помимо прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа будет оказывать благоприятное действие. В частности, анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, предупреждения и/или уменьшения любого заболевания или нарушения, связанного с или опосредованного экспрессией или активностью CD20 или пролиферацией В-клеток CD20+. Механизм действия, посредством которого осуществляют терапевтические способы согласно изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих CD20, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством апоптоза, фагоцитоза или

комбинации двух или более таких механизмов или сходных цитотоксических механизмов. Клетки, экспрессирующие CD20, которые можно ингибировать или уничтожать с помощью биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению, включают, например, канцерогенные В-клетки.

Снижение опухолевой нагрузки или регрессия опухоли включает частичное или полное исчезновение опухоли или опухолей у субъекта. Понятно, что регрессия опухоли представляет собой тенденцию в направлении снижения опухолевой нагрузки или менее тяжелого состояния заболевания. Следовательно, регрессия представляет собой прогрессирующее уменьшение определяемых злокачественных образований в организме, включая уменьшение размера опухоли и/или уменьшения числа опухолей. Снижение развития опухоли включает частичное или полное ингибирование или подавление дополнительного или нового роста опухоли.

Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и оболочках головного мозга, ротовой части глотки, легких и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужском и женском репродуктивном тракте, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кровеносных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящем тракте и специальных сенсорных органах, таких как глаз. В определенных вариантах реализации биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению применяют для лечения одного или более из следующих видов рака: почечно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака простаты, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы или меланомы. В соответствии с определенными типовыми вариантами реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению применяют для лечения В-клеточного рака (например, ходжкинской лимфомы, неходжкинской лимфомы [НХЛ], лимфобластного лейкоза/лимфомы из В-клеток-предшественников, новообразований из зрелых В-клеток, хронического В-клеточного лимфоцитарного лейкоза/лимфомы/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной лимфомы из клеток центра фолликула, В-клеточной лимфомы маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, плазматомы, плазматоклеточной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы).

Анти-CD3/анти-CD20 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению вводят в количестве, достаточном для снижения опухолевой нагрузки, стимуляции регрессии опухоли, ингибирования роста опухоли или снижения развития опухоли у субъекта. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет от около 0,001 до около 1 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,4 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,04 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения вводимое количество составляет около 0,004 мг/кг.

В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения антигенсвязывающие молекулы применяют для лечения пациента, пораженного В-клеточной лимфомой (например, НХЛ), которая устойчива или не полностью восприимчива к терапии одним анти-CD20 (например, устойчива к терапии ритуксимабом). В соответствии с другими родственными вариантами реализации изобретения предложены способы, включающие введение раскрытой в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы пациенту, пораженному В-клеточной лимфомой (например, НХЛ), которая является рефрактерной в отношении терапии анти-CD20 (например, пациенту с рефрактерной в отношении ритуксимаба опухолью или с рецидивной или рефрактерной В-клеточной лимфомой). Известные в данной области техники аналитические/диагностические методы, такие как сканирование опухоли и т.д., можно применять для того, чтобы убедиться в том, что пациент имеет опухоль, устойчивую или не полностью восприимчивую, или рефрактерную к терапии одним анти-CD20.

Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. В контексте данного документа термин "остаточный рак" означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток в организме субъекта после лечения с помощью противораковой терапии.

В соответствии с определенными аспектами в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией CD20 (например, В-клеточной лимфомы), включающие введение субъекту одной или более биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте данного документа, после того, как субъект прошел монотерапию анти-CD20 (например, после введения фармацевтической композиции, содержащей анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб). Например, настоящее изобретение включает способы лечения В-клеточной лимфомы, включающие введение пациенту анти-CD3/анти-CD20 биспецифической антигенсвязывающей молекулы через 1, 2, 3, 4, 5, 6 суток, 1, 2, 3 или 4 недели, 2, 4, 6, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект проходил монотерапию анти-CD20 (например, лечение ритуксимабом или лечение его эквивалентом).

Комбинированная терапия и составы

В настоящем изобретении предложены способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любое из типовых антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. К типовым дополнительным терапевтическим агентам, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно настоящему изобретению, относятся, например, антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефинитиб или эрлотиниб]), антагонист другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- α (например, анти-PDGFR- α антитело), ингибитор PDGFR- β (например, анти-PDGFR- β антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, см., например, US 7087411 (также называемый в данном документе "ингибирующим VEGF слитым белком"), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецепторов VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, раскрытое в US 2009/0142354), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (например, анти-FOLH1 антитело), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMRSS2 (например, анти-TMRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина), моновалентный антагонист CD20 (например, моновалентное анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб) и т.д. Другие агенты, которые обеспечивают преимущество при введении в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно изобретению, включают 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 раскрытую в данном документе анти-CD3/анти-CD20 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу), также можно вводить в качестве части терапевтической схемы, включающей применение одной или более терапевтических комбинаций, выбранных из "ICE": ифосфамида (например, Ифекс®), карбоплатина (например, Параплатин®), этопозид (например, Этопофос®, Топозар®, Вепезид®, VP-16); "DHAP": дексаметазона (например, Декадрон®), цитарабина (например, Цитозар-U®, цитозина арабинозид, ага-С), цисплатина (например, Платинол®-AQ); и "ESHAP": этопозид (например, Этопофос®, Топозар®, Вепезид®, VP-16), метилпреднизолона (например, Медрол®), высокой дозы цитарабина, цисплатина (например, Платинол®-AQ).

Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из указанных в данном документе антигенсвязывающих молекул и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеуказанных цитокинов, при этом ингибитор является аптамером, антисмысловой молекулой, рибозимом, миРНК, пептителом, нанотелом или фрагментом антитела (например, фрагментом Fab; фрагментом F(ab')₂; фрагментом Fd; фрагментом Fv; scFv; фрагментом dAb; или другими сконструированными молекулами, такими как диатела, триатела, мини-тела и минимальные распознающие компоненты).

Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить и/или смешивать в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВС. Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить в качестве части схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

Дополнительные терапевтически активные компоненты можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению (в целях настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему изобретению смешивают с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте данного документа.

Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения множественные дозы антигенсвязывающей молекулы (например, анти-CD3 антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает CD20 и CD3) можно вводить субъекту в течение определенного курса. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное

введение субъекту множественных доз антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. В контексте данного документа "последовательное введение" означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, за которой следует одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, одна или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. Таким образом, "начальная доза" или "первая доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но в общем случае могут отличаться друг от друга в терминах частоты введения. При этом в определенных вариантах реализации изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, скорректировано в большую или меньшую сторону в зависимости от ситуации) во время курса лечения. В определенных вариантах реализации изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующими дозами, вводимыми с меньшей частотой (например, "поддерживающими дозами").

Было обнаружено, что введение первой дозы, вводимой при минимальной концентрации, а затем последующей или второй дозы, вводимой в количестве, в два или три раза превышающем первую дозу, будет оказывать благоприятное действие на пациента.

В некоторых вариантах реализации изобретения первую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят пациенту последовательно в течение первого периода времени, а последующую вторую дозу указанной антигенсвязывающей молекулы вводят пациенту последовательно в течение второго периода времени, при этом указанная вторая доза превышает указанную первую дозу. В других вариантах реализации изобретения первую дозу вводят раз в неделю или дважды в неделю в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель. В другом варианте реализации изобретения вторую дозу вводят раз в неделю, дважды в неделю, раз в месяц или дважды в месяц в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель или месяцев.

В одном типовом варианте реализации настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предыдущей дозы. В контексте данного документа выражение "непосредственно предыдущая доза" означает, в случае последовательности из множества введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности, без каких-либо промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту множества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает CD20 и CD3). Например, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах реализации изобретения, включающих применение множества вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и остальные вторичные дозы.

Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предыдущей дозы. Аналогично, в вариантах реализации изобретения, включающих применение множества третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и остальные третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предыдущей дозы. В альтернативном варианте частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться в течение курса схемы лечения. Частота введения также может корректироваться лечащим врачом во время курса лечения в зависимости от нужд индивидуального пациента после клинического обследования.

Диагностические применения антител

Анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или определения CD3 или CD3-экспрессирующих клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, анти-CD3хCD20 антитело или его фрагмент можно применять для диагностики патологического состояния, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостатком экспрессии, отсутствием экспрессии и т.д.) CD3. Типовые диагностические методы анализа

CD3 могут включать, например, приведение полученного от пациента образца в контакт с анти-CD3хCD20 антителом согласно изобретению, при этом антитело помечено выявляемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте в диагностических целях можно применять немеченое анти-CD3хCD20 антитело в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено выявляемой меткой. Выявляемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентное или хемилюминесцентное вещество, такое как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые методы анализа, которые можно применять для выявления или определения CD3 в образце, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Анти-CD3хCD20 антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или определения CD20 или CD20-экспрессирующих клеток в образце или, аналогично, для того, чтобы диагностировать патологическое состояние или заболевание, характеризующейся aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостатком экспрессии, отсутствием экспрессии и т.д.) CD20.

Образцы, которые можно применять в диагностических методах анализа CD3 или CD20 в соответствии с настоящим изобретением, включают образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит выявляемые количества белков CD3 и/или CD20 или их фрагментов в нормальных или патологических условиях. В общем случае сначала измеряют уровни CD3 или CD20 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или патологическим состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью CD3 или CD20), чтобы установить базовый или стандартный уровень CD3 или CD20. Этот базовый уровень CD3 или CD20 можно затем сравнивать с уровнями CD3, измеренными в образцах, полученных от индивидов, предположительно имеющих связанное соответственно с CD3 или CD20 заболевание или патологическое состояние.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и композиции согласно изобретению, и не ограничивают объем того, что авторы считают своим изобретением. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать наличие некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, доли представлены в долях по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление соответствует или приближено к атмосферному.

Пример 1. Создание анти-CD3 и анти-CD20 антител

Известно несколько способов выделения анти-CD3 или анти-CD20 антител. Полностью человеческие анти-CD3 антитела, применяемые в следующих примерах, были выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

В указанных способах можно применять дополнительные примеры анти-CD3 антител, а описание таких антител и биологические свойства таких анти-CD3 антител описаны в международной заявке согласно РСТ № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Типовые анти-CD20 антитела и биологические свойства таких анти-CD20 антител описаны в US 7879984 и международной заявке согласно РСТ № PCT/US13/60511, поданной 19 сентября 2013 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

Анти-CD20 антитело и способ создания антитела, применяемые для конструирования биспецифических антител в этом примере, соответствуют описанным в US 7879984.

Аминокислотные обозначения переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR, применяемых для конструирования анти-CD3 антигенсвязывающего плеча и анти-CD20 связывающего плеча биспецифических антител согласно изобретению, приведены в табл. 1. Соответствующие обозначения нуклеотидных последовательностей приведены в табл. 2.

Таблица 1. Обозначения аминокислотных последовательностей (SEQ ID NO)

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Анти-CD20	2	4	6	8	18	20	22	24
Анти-CD3	10	12	14	16	18	20	22	24

Таблица 2. Обозначения нуклеотидных последовательностей (SEQ ID NO)

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Анти-CD20	1	3	5	7	17	19	21	23
Анти-CD3	9	11	13	15	17	19	21	23

Пример 2. Создание биспецифических антител, которые связывают CD3 и CD20

Конструировали биспецифические антитела, содержащие анти-CD3-специфический связывающий домен и анти-CD20-специфический связывающий домен, с вышеуказанными последовательностями, используя стандартные методики, в которых тяжелую цепь и легкую цепь из анти-CD3 антитела комбинировали с тяжелой цепью из анти-CD20 антитела.

Таким образом, биспецифические антитела, созданные в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т.е. связывающих плеча). Первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, полученную из анти-CD20 антитела ("CD20-VH"), сопряженную с вариабельной областью легкой цепи, полученной из анти-CD3 антитела ("CD3-VL"). Сопряжение CD20-VH/CD3-VL создает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD20. Второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, полученную из анти-CD3 антитела ("CD3-VH"), сопряженную с вариабельной областью легкой цепи, полученной из анти-CD3 антитела ("CD3-VL"). Сопряжение CD3-VH/CD3-VL создает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD3. Такую же CD20-VH применяли во всех биспецифических антителах, созданных в этом примере, и обозначали "CD20-VH-A".

Константный домен тяжелой цепи (CH) дикого типа для каждой тяжелой цепи замещали химерным CH с помощью рекомбинантных технологий. CH одного связывающего плеча (например, анти-CD3 связывающего плеча) содержит мутацию в CH3-области CH, которая облегчает выделение биспецифического антитела.

Обобщенные данные по составляющим частям различных биспецифических антител, созданных в соответствии с примером, приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Обозначения аминокислотных последовательностей

Название биспецифического антитела	Анти-CD20 антигенсвязывающий домен			Анти-CD3 антигенсвязывающий домен		
	Вариабельная область тяжелой цепи	Константная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи	Константная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Антитело 1	2	26	18	10	28	18
Антитело 2	2	30	18	10	32	18

Таблица 4. Обозначения нуклеотидных последовательностей

Название биспецифического антитела	Анти-CD20 антигенсвязывающий домен			Анти-CD3 антигенсвязывающий домен		
	Вариабельная область тяжелой цепи	Константная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи	Константная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Антитело 1	1	25	17	9	27	17
Антитело 2	1	29	17	9	31	17

В табл. 5 и 6 приведены обозначения аминокислотных последовательностей для различных вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 5) и вариабельных областей легкой цепи (табл. 6) со своими соответствующими CDR для биспецифических антител в этом примере.

Таблица 5. Обозначения аминокислотных последовательностей тяжелой цепи

Обозначение тяжелой цепи	Вариабельная область	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Константная область
	тяжелой цепи (HCVR)				тяжелой цепи (CH)
CD20-VH-CH-A	2	4	6	8	26, или 28, или 30, или 32
CD3-VH-CH-A	10	12	14	16	

Таблица 6. Обозначения аминокислотных последовательностей легкой цепи

Обозначение легкой цепи	Вариабельная область легкой цепи (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	18	20	22	24

Кроме того, в табл. 7 и 8 приведены обозначения последовательностей для нуклеотидных последовательностей, кодирующих различные вариабельные области тяжелой цепи (табл. 7), константные вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи (табл. 8) с их соответствующими CDR, для биспецифических антител в этом примере.

Таблица 7. Обозначения нуклеотидных последовательностей тяжелой цепи

Обозначение тяжелой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи (HCVR)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Константная область тяжелой цепи (HCVR)
CD20-VH-A	1	3	5	7	25, или 27, или 29, или 31
CD3-VH-A	9	11	13	15	

Таблица 8. Обозначения нуклеотидных последовательностей легкой цепи

Обозначение легкой цепи	Вариабельная область легкой цепи (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	17	19	21	23

Кроме описанных выше биспецифических антител в определенных экспериментах, приведенных в примерах, применяли следующие контрольные антитела:

Контрольное антитело 1: Моноклональное антитело "ОКТ-3" против человеческих Т-клеточных поверхностных антигенов, описанное в US 4361549 и доступное из гибридомы CRL-8001 (Американская

коллекция типовых культур, Manassas, VA).

Контрольное антитело 2: Антитело "SP34", реактивное антитело против эpsilon-цепи комплекса Т3 на человеческих клетках Т-лимфоцитов, доступное от BD Pharmagen, Cat # 55052.

Контрольное антитело 3: Анти-CD20 терапевтическое антитело, имеющее последовательности тяжелой и легкой цепей ритуксана (ритуксимаб), раскрытые в US 5736137.

(Контрольное) антитело 4: Также известное как CD3хCD20 антитело с Fc дикого типа (дтFc), это антитело было создано по аналогии с вышеописанными способами и имеет анти-CD20 плечо, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/18 (аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24) и CH-область IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 45); и анти-CD3 плечо, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 10/18 (аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24) и CH-область IgG1 дикого типа с двумя аминокислотными модификациями (SEQ ID NO: 48) в CH3-домене для облегчения выделения. CD3хCD20 антитело-дтFc (Антитело 4) может называться сходным контрольным антителом, имеющим Fc-домен IgG1 дикого типа (т.е. сходный с антигенсвязывающими доменами антител CD3хCD20-химерный Fc согласно изобретению), в целях сравнения эффекторных функций антител или других свойств с антителами, имеющими отличные последовательности или структуру Fc-домена.

Контрольное антитело 5: Анти-FelD1 моноклональное антитело связывает кошачий антиген и не обладает перекрестной реактивностью с человеческим CD20 или CD3. Это неспецифическое контрольное IgG1 антитело было получено способами, описанными в публикации согласно PCT № WO2013/166236, опубликованной 7 ноября 2013 г.

Контрольное антитело 6: Анти-FelD1 антигенсвязывающий домен, описанный в публикации согласно PCT № WO2013/166236, конструировали, как описано в данном документе, так, чтобы он содержал химерный Fc-домен IgG4 аналогично с Ab1. Контрольное Ab6 не обладает перекрестной реактивностью с человеческим CD20 или CD3, но имеет сходную эффекторную функцию с Ab1.

Пример 3. Конструирование химерной тяжелой цепи

Создание химерных тяжелых цепей, например, химерной CH IgG4 (SEQ ID NO: 26) и химерной CH IgG1 (SEQ ID NO: 30), проводили, используя стандартные технологии клонирования. Сначала создавали химерную CH IgG4 с помощью двухэтапного процесса ПЦР-амплификации. Два ПЦР-фрагмента, фрагмент 1 и 2, амплифицировали, используя стартовую векторную конструкцию pR001 содержащую ДНК CH hIgG4 дикого типа, используя пары праймеров, фланкирующие CH-область, P1-P2 и P3-P4 соответственно. См. табл. 9, ниже. Праймеры вносили во фрагменты как необходимую последовательность нижней шарнирной области IgG2 (которая кодирует SEQ ID NO: 52), так и фланкирующие сайты рестрикции. Затем эти два фрагмента соединяли, используя ПЦР-праймеры P2 и P4. Полученную в результате последовательность вставляли в pR001 с помощью сайтов рестрикции Xho1-Not1, создавая векторную конструкцию pR002, которая содержит химерную CH IgG4, имеющую последовательности нижней шарнирной области IgG2. Последовательность подтверждали с помощью праймеров P10 и P11.

Кроме того, химерную CH IgG1 создавали с помощью многоэтапной ПЦР-амплификации. Фрагмент 1а создавали, используя праймеры P2 и P5 (см. табл. 9, ниже), с матрицы pR85503 (которая содержит ДНК человеческой CH IgG1 дикого типа). Фрагмент 2а амплифицировали с праймерами P6 и P8, используя в качестве матрицы pR002 (содержащий ДНК химерной CH IgG4). Фрагмент 3 создавали, используя праймеры P7 и P9, с матрицы pR003 (ДНК CH hIgG1 дикого типа; SEQ ID NO: 45). Фрагменты 1а и 2а соединяли, используя праймеры P2 и P8, что приводило к созданию фрагмента 4. Соединение фрагментов 2а и 3 с использованием праймеров P6 и P9 создавало фрагмент 5. Затем фрагменты 4 и 5 сливали, используя праймеры P2 и P9. Полученную в результате последовательность вставляли в pR001 с помощью сайтов рестрикции Xho1-Not1, создавая конструкцию pR004, которая содержит константную область IgG1 с нижней шарнирной областью IgG2 и CH2-доменом IgG4. Последовательность подтверждали, используя праймеры P10 и P11.

Таблица 9. Праймеры для ПЦР-генерации химерных нуклеотидных конструкций С_H

Название праймера	Последовательность праймера (SEQ ID NO)
P1	5'- TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGG ACACCGT -3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 63)
P2	5'-AAGCTTATACTCGAGCTCTAGATTGGGAACCCGGGTCTCT-3' (SEQ ID NO: 64)
P3	5'- CCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCC CAAAA-3' (SEQ ID NO: 65)
P4	5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCC GGCG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 66)
P5	5'- CTCGGGTTTAGAACACTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGG ACACCGT-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 67)
P6	5'- AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACACCTGTG- 3' (SEQ ID NO: 68)
P7	5'- GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC C-3' (SEQ ID NO: 69)
P8	5'-CTCTTTTGGTAGAGGTTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 70)
P9	5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCCGGCG-3' (антисмысловая) (SEQ ID NO: 71)
P10	5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (SEQ ID NO: 72)
P11	5'-ATACATTATACGAAGTTATACCGGTA-3' (SEQ ID NO: 73)

Пример 4. CD20хCD3 биспецифические антитела избирательно связывают клетки Jurkat, Raji и обес-
зьяны Т-клетки по сравнению с моноспецифическими антителами

CD3хCD20 антитело-дтFc (Контрольное антитело 4) сравнивали с моноспецифическими Контроль-
ными антителами, приведенными в примере 2, методом связывания FACS в отношении их способности
связываться с Jurkat (CD3+, CD20 - линия Т-клеток человека), Raji (CD3-, CD20+ - линия В-клеток чело-
века) или МКПК яванского макака ("клетки mkT").

Данные FACS получали, используя следующий протокол: Клетки при 2×10^5 на лунку инкубировали
с серийными разведениями антител в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали и до-
бавляли соответствующее вторичное антитело (клетки Jurkat, RAJI) или коктейль из вторичных антител
(МКПК яванского макака), и инкубировали в течение дополнительных 30 мин. После инкубации клетки
промывали, пересуспендировали в охлажденном ФСБ, содержащем 1% БСА, и анализировали методом
проточной цитометрии на инструменте BD FACS Canto II. Гейтинг клеток Jurkat и Raji проводили при
боковом и прямом рассеянии, тогда как гейтинг Т-клеток яванского макака проводили также в популя-
ции CD2+CD4+. EC₅₀ для клеточного связывания при разных титрах определяли с помощью программ-
ного обеспечения Prism, а значения рассчитывали, используя 4-параметрический нелинейный регресси-
онный анализ. Результаты приведены в табл. 10.

Таблица 10. Значения EC_{50} связывания (молярные) для моноспецифических и CD3xCD20 биспецифических антител

Антитело	FACS - Jurkat	FACS - RAJI	FACS - клетки мкТ
Контроль 1 (анти-CD3)	1,96E-10	OC	OC
Контроль 2 (анти-CD3)	(+)	OC	7,03E-11
Контроль 3 (анти-CD20)	Отсутствие связывания	(+)	OC
Контроль 4 (Анти-CD3xCD20, CH дикого типа)	3,85E-08	5,99E-08	8,74E-06

(+) значения EC_{50} не определены, но связывание наблюдается;

OC - отсутствие связывания;

НИ - не исследовано

Как показано в табл. 10, панель исследуемых антител демонстрировала диапазон значений аффинности связывания для разных клеточных линий в зависимости от их специфичности. Биспецифическое Контрольное антитело 4 демонстрировало способность связываться с линиями-мишенями как человека, так и яванского макака. Контрольное антитело 4 содержит такие же анти-CD3xCD20 вариабельные области, что и Антитело 1 и Антитело 2 согласно изобретению, но имеет CH-область IgG1 дикого типа. Анти-CD3 Контроль 1 (ОКТ3), анти-CD3 Контроль 2 (SP34) и анти-CD20 Контроль 3 связывались с клетками Jurkat, Т-клетками яванского макака и клетками RAJI соответственно.

Пример 5. CD20xCD3 биспецифические антитела с CH дикого типа индуцируют цитотоксичность в отношении клеток Raji в присутствии активированных Т-клеток

Способность CD20xCD3 биспецифических антител перенаправлять опосредованное Т-клетками уничтожение на CD20-экспрессирующие клетки Raji исследовали в *in vitro* анализе цитотоксичности. Кроме того, также исследовали способность биспецифических и родительских анти-CD3 антител уничтожать клетки U937 посредством взаимодействий Fc/FcR.

Анализ уничтожения с кальцеином проводили, используя следующий протокол: МКПК человека и яванского макака выделяли в градиенте фиколл-пак или с помощью среды для разделения клеток Lympholyte Mammal соответственно. Выделенные МКПК активировали в течение нескольких дней средой, содержащей рекомбинантный человеческий IL-2 (30 Е/мл) и гранулы для активации Т-клеток (анти-CD3/CD28 для МКПК человека, анти-CD2/CD3/CD28 для МКПК яванского макака).

Клетки-мишени (Raji в случае CD20-опосредованного уничтожения и U937 в случае FcR-опосредованного уничтожения) метили кальцеином и инкубировали с активированными Т-клетками при соотношении эффектор:мишень 10:1, используя 3-кратные серийные разведения антител, в течение 3 ч при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали, а супернатанты переносили в пропускающий свет черный планшет с прозрачным дном для проведения флуоресцентного анализа. EC_{50} , то есть, молярную концентрацию биспецифического антитела, которая индуцирует 50% цитотоксичности, определяли с помощью Prism. Значения рассчитывали, используя 4-параметрический нелинейный регрессионный анализ. Результаты обобщены в табл. 10.

Таблица 11. Значения EC_{50} для CD20 x CD3-индуцированной цитотоксичности в отношении клеток Raji и U937

Антитело	Цитотоксичность Raji, Т-клетки человека [М]	Цитотоксичность Raji, Т-клетки обезьяны [М]	Цитотоксичность U937, Т-клетки человека [М]
Контрольное Аб 1 (анти-CD3)	OA	OA	3,04E-12
Контрольное Аб 4 (Анти-CD3xCD20)	5,63E-11*	1,27E-12*	8,86E-11*

(*) Данные представляют собой медианные значения по 3 или более независимым экспериментам.

Данные без (*) представляют собой репрезентативные/средние значения по 1 или 2 независимым анализам.

OA=Отсутствие активности

Как показано в табл. 11, биспецифическое CD20 x CD3 антитело, содержащее специфические в отношении человека и перекрестно-реактивные в отношении яванского макака анти-CD3 плечи и СН-область IgG1 дикого типа, было способно специфически перенаправлять цитотоксичность на клетки Raji в присутствии активированных Т-клеток человека. В присутствии активированных Т-клеток яванского макака уничтожение Raji происходило, когда их инкубировали с контрольным биспецифическим антителом Ab4, которое имеет анти-CD3 плечо, которое активирует Т-клетки обезьяны. Как специфическое антитело, так и контрольное Ab1 (анти-CD3 mAb) демонстрировали активность в анализе Fc/FcR-зависимого уничтожения U937. Эту активность можно блокировать путем добавления в реакцию блокирующего неспецифического человеческого IgG (Данные не показаны).

Пример 6. CD20 x CD3 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную эффекторную функцию в анализе КЗЦ

CD20xCD3 биспецифические антитела с химерными СН-областями (Антитело 1 и Антитело 2), описанные в Примере 2, конструировали так, чтобы изменить или снизить их эффекторную функцию. По сравнению с антителами, содержащими константную область тяжелой цепи дикого типа (дт) изотипа IgG1 (Контрольное Ab4), аминокислотные замены в СН-области могут препятствовать способности Fc Ig связываться со своим(и) рецептор(ами). Следовательно, могут меняться сигнальные и иммунные ответы, такие как активация В-клеток или фагоцитоз. Исследовали действие аминокислотных модификаций в СН-области на эффекторную функцию комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) (в этом примере) и антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Пример 7).

Чтобы исследовать действие Антитела 1 и Антитела 2 на эффекторную функцию КЗЦ, CD20-экспрессирующие клетки Raji (мишени) (5000/лунку) или клетки Daudi высевали в присутствии 5% человеческого сывороточного комплемента. К клеткам добавляли серийные разведения Антитела 1, Антитела 2 и контрольных антител, начиная с 100 нМ, в течение 4 ч при 37°C. Лизис клеток-мишеней определяли с помощью набора CytoTox Glo™ (Promega) и рассчитывали процент цитотоксичности.

Процент цитотоксичности рассчитывали с помощью уравнения:

$$\% \text{ цитотоксичности} = ((L_S - L_{SR}) / (L_{MR} - L_{SR})) * 100\%,$$

где L_{SR} - базовая люминесценция клеток-мишеней, а L_{MR} - максимальное высвобождение кальцеина из клеток, лизированных дигитонином. EC_{50} для цитотоксичности определяли с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad). Значения, рассчитанные с помощью 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа, приведены в табл. 12 и на фиг. 5А и 5В.

КЗЦ-активность Антитела 1 и Антитела 2 против клеток Daudi и Raji значительно снижена по сравнению с соответствующим антителом, имеющим константную область тяжелой цепи дт. См. табл. 12 и фиг. 5А/В. Некоторую КЗЦ-активность наблюдали для Антитела 1 против клеток Raji, однако общие результаты показывают, что химерные антитела вызывают более слабые эффекторные ответы, чем контрольные антитела IgG1 с Fc дт.

Таблица 12. CD20xCD3 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную активность в анализе КЗЦ для определения эффекторной функции

Клетка-мишень →	КЗЦ			
	Daudi		Raji	
	EC_{50} [M]	Максимальная цитотоксичность (%)	EC_{50} [M]	Максимальная цитотоксичность (%)
Контрольное Ab 4	6,12E-08	~95	1,98E-08	~85
Ab 1	OA	OA	2,86E-08	~45
Ab 2	OA	OA	3,49E-08	~10

OA: Отсутствие активности

Пример 7. CD3xCD20 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную эффекторную функцию в анализе АЗКЦ

Чтобы исследовать действие Антитела 1 и Антитела 2 по сравнению с биспецифическим антителом с СН-областями дикого типа (и идентичными варьируемыми областями) на эффекторную функцию АЗКЦ, свежeweделенные нестимулированные CD56-положительные NK-клетки или NK92-клетки, сконструированные, чтобы экспрессировать более высокоаффинный V-аллель FcγRIIIa, высевали с мечеными кальцеином CD20-положительными клетками Raji или Daudi в присутствии антител с химерными СН (Антитело 1 и Антитело 2) и контрольного антитела с СН дт (Контрольное антитело 4). Отслеживали высвобождение кальцеина из клеток-мишеней и определяли процент цитотоксичности. Процент цитотоксичности и EC_{50} рассчитывали, как описано для анализа КЗЦ, выше. Результаты приведены в табл.

13 и на фиг. 6А и 6В.

Антитела с химерной СН, Антитело 1 и Антитело 2, не опосредуют АЗКЦ активность (табл. 13) против клеток Raji или Daudi.

Таблица 13. CD3 x CD20 биспецифические антитела, содержащие химерные СН-области, демонстрируют сниженную активность в анализе АЗКЦ для определения эффекторной функции

АЗКЦ				
Клетка-мишень →	Daudi		Raji	
	EC50 [M]	Максимальная цитотоксичность (%)	EC50 [M]	Максимальная цитотоксичность (%)
Контрольное Ab 4	1,87E-10	~70 [#]	1,48E-09	~65 [#]
Ab 1	ОА	ОА	ОА	ОА
Ab 2	ОА	ОА	ОА	ОА

ОА: Отсутствие активности;

[#]: фоновая цитотоксичность ~20%

Пример 8. Аффинности связывания и кинетические константы химерных антител, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса

Анти-CD3 x анти-CD20 биспецифические антитела, имеющие химерные константные области тяжелой цепи, Антитело 1 и Антитело 4, анализировали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Biacore), чтобы определить их кинетические параметры связывания с Fcγ-рецепторами человека и яванского макака. Изотипические контроли, а именно Изотипический контроль дт-IgG1 и Изотипический контроль дт-IgG4 CPPC, исследовали тем же методом.

Вкратце, эксперименты ППР проводили при 25°C на инструменте Biacore T200, используя покрытый карбоксиметилдекстраном чип (CM-5). Мышиное моноклональное антитело против пентагистидина (GE Healthcare) иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа CM-5 посредством стандартного аминного сопряжения. Проводили захват 140 RU - 376 RU His-меченых человеческих или обезьяньих белков FcγR на иммобилизованном путем аминного сопряжения на чипе CM-5 антитела против пентагистидина, а маточные растворы антител инжестировали поверх захваченных белков при 20 мкл/мин в течение 2,5 мин. Отслеживали реакцию связывания mAb, и для низкоаффинных рецепторов рассчитывали установившееся равновесное связывание. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и аппроксимации данных 1:1 моделью связывания, используя программное обеспечение для подбора кривых Scrubber 2.0. Равновесные константы диссоциации (K_d) для связывания и диссоциативные времена полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали по кинетическим константам скорости как: $K_d (M) = k_d/k_a$; и $t_{1/2} (мин) = (ln2)/(60*k_d)$.

Таблица 14. Кинетические параметры связывания для антител с тяжелой цепью дикого типа (дт) и химерной тяжелой цепью

Связывание с His-захваченных человеческим FcγRI при 25°C				
Антитело	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_d (10 ⁻⁹ M)	$t_{1/2}$ (мин)
Изотипический контроль дт-IgG1	1,74E+05	7,48E-04	4,3	15
Изотипический контроль дт-IgG4 CPPC	1,71E+05	2,36E-03	13,9	5
Ab 1	ОС	ОС	ОС	ОС
Ab 2	ОС	ОС	ОС	ОС

ОС: Отсутствие выявляемого связывания

Как демонстрируют результаты в табл. 14, биспецифические антитела, Антитело 1 и Антитело 2, демонстрируют отсутствие связывания с человеческим FcγRI по сравнению с антителами, имеющими СН-область hIgG1 дикого типа (дт) или hIgG4-CPPC, в анализе ППР. Биспецифические антитела с химерной тяжелой цепью согласно настоящему изобретению также демонстрируют слабое или отсутствующее связывание в отношении нескольких низкоаффинных человеческих FcRγ-рецепторов (например, слабое связывание с человеческим FcRγIIA, FcRγIIB, и отсутствие выявляемого связывания с человеческим FcRγI, FcRγIIIA или FcRγIIIB) по сравнению с антителами с Fc-последовательностью дт hIgG1 или

hIgG4-CPPC (табл. 15, ниже).

Таблица 15. Установившееся равновесное связывание для антител с тяжелой цепью дикого типа (дт) и химерной тяжелой цепью

Связывание с His-захваченными низкоаффинными FcγR-рецепторами человека и яванского макака при 25 °C									
Исследуемое антитело	Значения K _d (10 ⁻⁶ M) для связывания низкоаффинного FcγR с антителами с химерной тяжелой цепью								
	hFcγRIIA (H131) человека	FcγRIIA (R131) человека	FcγRIIA яванского макака	FcγRIIB человека	FcγRIIB яванского макака	FcγRIIA (I176) человека	FcγRIIA (F176) человека	FcγRIIA яванского макака	FcγRIIB человека
Изотипический контроль дтIgG1	1,1	2	4,2	2	4,2	1,5	1,3	0,6	2,3
Изотипический контроль дтIgG4 (CPPC)	12	10	19,3	9,8	9,6	10	26	5,8	OC
Ab 1	12	19,3	23,1	123	13,9	OC	OC	66,3	OC
Ab 2	11,7	20,5	23,5	233	14,6	OC	OC	42,4	OC

OC: Отсутствие выявляемого связывания

Пример 9. Фармакокинетический профиль химерных антител

Оценивали токсикокинетический профиль Антитела 1 и Антитела 2, получая образцы крови от самцов яванских макаков (3 животных/группу обработки), получавших одну 30-минутную ВВ инфузию с последующим 12-недельным периодом наблюдения. Образцы крови для токсикокинетического анализа общей концентрации лекарственного препарата в сыворотке крови брали перед дозированием и после дозирования через 5 минут и 5, 24, 48, 72 и 168 часов, и на 14, 21, 35, 49, 66 и 84 день. Полученные образцы сыворотки анализировали методом прямого ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), чтобы определить общую концентрацию препарата Ab 1 или Ab 2. Токсикокинетику исследуемых препаратов оценивали с помощью некомпартментного анализа (Phoenix WinNonLin), чтобы определить фармакокинетические параметры. Результаты приведены в табл. 16 (ППК=площадь под кривой концентрация-время; C_{макс}=наблюдаемая максимальная концентрация в сыворотке).

Таблица 16. Фармакокинетический профиль химерных антител в сыворотке яванских макаков после одной внутривенной инфузии

Параметр	Единицы	1 мг/кг		1 мг/кг	
		Ab 2		Ab 1	
		Среднее	СО	Среднее	СО
C _{макс}	мкг/мл	33,4	3,79	26,0	4,72
C _{макс} /Доза	кг*мкг/мл/мг	33,4	3,79	26,0	4,72
T _{макс}	день	0,0243	0	0,0243	0
ППК _{0-168 ч}	день*мкг/мл	100	20,1	61,1	8,04
ППК _{0-168 ч} /Доза	день*кг*мкг/мл/мг	100	20,1	61,1	8,04
T _{1/2}	День	8,14	1,15	14,0	2,64

После одной внутривенной дозы 1,0 мг/кг Ab 1 и Ab 2 у яванских макаков наблюдали среднюю пиковую концентрацию (C_{макс}) 33,4 и 26,0 мкг/мл соответственно, и средние значения ППК_{0-168ч} 100 и 61,1 день*мкг/мл соответственно. Кажущийся конечный период полувыведения был оценен в 8,14-14,0 дней для этих двух молекул. Данные свидетельствуют о том, что постоянное воздействие Ab 1 и Ab 2 сохранялось у всех животных в течение большей части 12-недельного периода наблюдения, при этом воздействие было сопоставимо во всех группах обработки. Очевидной иммуногенности исследуемых препаратов не наблюдалось. Общие фармакокинетические профили Ab 1 и Ab 2 типичны для моноклональных антител, вводимых яванским макакам.

Пример 10. CD3 x CD20 биспецифические антитела могут снижать число В-клеток CD20+ у яванских макаков при более низких дозах, чем моноспецифическое антитело

Чтобы определить in vivo эффективность введения CD3xCD20 биспецифического антитела, Антитела 1 и Контрольного антитела 4, исследовали изменения в уровнях В-клеток CD20+ в периферической крови яванских макаков методом FACS после введения анти-CD3xCD20 биспецифического антитела по сравнению с моноспецифическим анти-CD20 антителом (Контрольное Ab 3). Исследование проводили на самцах яванских макаков (Macaca fascicularis), распределенных по восьми группам дозирования по 3 животных на группу дозирования, следующим образом: Группа 1 представляла собой плацебо-группу (введение базового раствора); Группа 2 получала моноспецифическое антитело (Контрольное Ab 3; ри-

туксан) в дозе 30 мг/кг (30 мг/кг для обезьяны эквивалентны человеческой дозе 375 мг/м², которая считается максимальной клинической дозой); Группа 3 получала биспецифическое CD3хCD20 Контрольное антитело 4 в дозе 0,01 мг/кг; Группа 4 - Антитело 4 в дозе 0,1 мг/кг; Группа 5 - Антитело 4 в дозе 1 мг/кг; Группа 6 - Антитело 1 в дозе 0,01 мг/кг; Группа 7 - Антитело 1 в дозе 0,1 мг/кг; и Группа 8 - Антитело 1 в дозе 1 мг/кг. Кровь брали на -7 день и -4 день перед дозированием животных. Дозы препарата антитела или базового раствора (плацебо) вводили путем в.в. инфузии, а кровь брали на 2, 4 и 7 дни после дозирования. Образцы крови анализировали методом FACS в отношении маркеров В-клеток (CD20; табл. 17) и Т-клеток (CD3, смотрите ниже) и определяли абсолютное число этих типов клеток.

Вкратце, 100 мкл крови в течение 3 мин инкубировали с 1,5 мл лизисного буфера для ККТ в пробирках Эппендорфа. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 0,4×g, промывали 2х промывочным буфером FACS (ФСБ+3% ФБС) и блокировали в течение 10 мин при комнатной температуре Fc-блокирующим реагентом. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с напрямую конъюгированными с флуоресцентными реагентами антителами к hCD45 и CD20. Количественное определение подгрупп В-клеток (CD20) или подгрупп Т-клеток (CD3) сначала проводили, используя стратегию гетерогенного гейтинга, состоящую во флуоресцентном окрашивании CD45 и демаркации характеристик бокового рассеяния (SSC) (CD45brightSSCdim) для установления популяций белых кровяных телец (БКТ). Затем популяции В-клеток определяли путем применения релевантных флуоресцентно меченых антител (CD20 APC-Cy7). После окрашивания клетки дважды промывали перед оценением методом FACS с помощью цитометра FACSCanto и анализом с помощью программного обеспечения FlowJo. Результаты приведены в табл. 17 и на фиг. 11А и 11В.

Таблица 17. Число циркулирующих CD45, CD20-положительных клеток в обезьяньей периферической крови после обработки

		Клетки CD20+ (ЕЗ/мкл) в день исследования				
Обработка	Животное №	-7	-4	2	4	7
Плацебо	78	1,87	2,69	1,85	2,09	1,62
	79	1,28	1,31	0,98	1,24	0,98
	80	2,41	2,90	2,23	2,71	1,78
Контрольное Ab 3	81	0,71	0,80	0,00	0,00	0,00
	82	0,97	2,49	0,00	0,00	0,00
	83	0,71	1,28	0,00	0,00	0,00
CD3хCD20-дтFc (Ab 4) 0,01 мг/кг	84	2,00	2,82	0,03	0,02	0,03
	85	1,23	1,96	0,00	0,00	0,00
	88	1,50	2,29	0,01	0,00	0,00
CD3хCD20-дтFc (Ab 4) 0,1 мг/кг	87	0,79	1,20	0,00	0,00	0,00
	88	1,72	3,05	0,00	0,00	0,00
CD3хCD20-дтFc (Ab 4) 1 мг/кг	89	0,28	0,60	0,00	0,00	0,00
CD3хCD20-дтFc (Ab 4) 1 мг/кг	90	0,63	1,02	0,00	0,00	0,00
	91	0,66	0,65	0,00	0,00	0,00
	92	0,56	1,50	0,00	0,00	0,00
Ab 1 0,01 мг/кг	93	1,16	1,96	0,00	0,00	0,00
	94	0,72	1,49	0,00	0,04	0,00
	95	1,95	1,94	0,02	0,02	0,01
Ab 1 0,1 мг/кг	96	0,48	0,60	0,00	0,00	0,00
	97	1,30	1,82	0,00	0,00	0,00
	98	4,87	5,00	0,00	0,00	0,00
Ab 1 1 мг/кг	99	0,23	0,34	0,00	0,00	0,00
	00	1,39	1,93	0,00	0,00	0,00
	01	2,29	2,30	0,00	0,00	0,00

Как показано в табл. 17 и на фиг. 11А, введение CD3хCD20 биспецифических антител и анти-CD20 моноспецифического антитела приводило к снижению числа циркулирующих В-клеток до исходных уровней в первый момент времени, когда проводили измерения (2 день). Это снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных. Сниженное число В-клеток в биспецифических группах сохранялось в течение 1 недели после 1 мг/кг дозирования биспецифическими антителами, и также сниженное число В-клеток сохранялось в биспецифических группах с 0,01 и 0,10 мг/кг дозой.

Также в этом эксперименте отслеживали уровни Т-клеток (CD3+) с помощью флуоресцентно мече-

ных анти-CD3 антител. Временное снижение числа циркулирующих Т-клеток наблюдали на 2 день после дозирования в группах биспецифических антител (Ab 4 и Ab 1; все дозы). В контрольной группе базового раствора (плацебо) и контрольной группе Ab 3 (ритуксан) не наблюдали снижение числа Т-клеток (ниже базовой линии) в моменты времени, когда проводили измерения. Уровни Т-клеток восстанавливались до исходных уровней в группах биспецифических антител на 4 день и оставались на исходном уровне до конца эксперимента (смотрите фиг. 11B).

In vivo эффективность CD3хCD20 биспецифических антител, Антитела 1 и Антитела 4, определяли в периферической крови яванских макаков в долгосрочном (3 месяца) исследовании, измеряя изменения в уровнях В-клеток CD20+ или уровнях Т-клеток CD3+, аналогично исследованию, описанному выше. Плацебо (базовый раствор) или биспецифические антитела вводили в дозе 1,0 мг/кг на день 0. Уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день в обеих группах биспецифических антител и оставались сниженными в течение всего исследования во всех образцах за исключением плацебо (смотрите фиг. 12A). Временное снижение числа Т-клеток наблюдали на 2 день в биспецифических группах, затем число Т-клеток восстанавливалось до исходных уровней на 4 день и оставалось в пределах базовой линии при измерениях в течение всего исследования (> 80 дней) для животных, обработанных биспецифическими антителами (фиг. 12B). У животных, обработанных плацебо, не наблюдали временное снижение числа Т-клеток.

Чтобы дополнительно определить in vivo эффективность CD3хCD20 биспецифических антител, Антитела 1 и Антитела 4, при низких дозах введения, в долгосрочном (2 месяца) исследовании в периферической крови яванских макаков измеряли изменения в уровнях В-клеток CD20+ или уровнях Т-клеток CD3+, аналогично экспериментам, описанным выше. Биспецифические антитела вводили в дозе 0,01 мг/кг или 0,001 мг/кг (1 мкг/кг) на день 0. Уровни В-клеток в периферической крови были значительно снижены на 2 день и оставались сниженными в течение всего исследования в обеих группах CD3хCD20 (фиг. 13A), аналогично тому, что наблюдали для животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (как видно в табл. 17 и на фиг. 11A или 12A). Животные, обработанные очень низкими дозами (1 мкг/кг) биспецифических антител, демонстрировали такое же временное снижение числа Т-клеток и восстановление, которое наблюдалось для животных, обработанных более высокими дозами CD3хCD20 биспецифических антител (смотрите фиг. 13B по сравнению с фиг. 11B или 12B).

Снижение числа В-клеток, наблюдаемое в описанных исследованиях, коррелировало со снижением числа циркулирующих антител в периферической крови животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc Антителом 1 (см. фиг. 14). Так как количество антитела в циркуляции животных снижалось со временем, популяции В-клеток начинали восстанавливаться (например, как наблюдалось на 81 день для животного № I06881).

Корреляция снижения числа В-клеток со снижением количества циркулирующего антитела в периферической крови также наблюдалась для животных, обработанных CD3хCD20-химерный Fc Антителом 2 (см. фиг. 15), учитывая, что когда количество антитела в циркуляции животных снижалось со временем, популяции В-клеток начинали восстанавливаться, например, как наблюдалось на 66 день для животного № I06876 и на 68 день для животного № I06877. Сходная корреляция также наблюдалась для животных, обработанных биспецифическим антителом CD3хCD20-дтFc (Ab 4) (см. фиг. 16). Так как количество антитела в циркуляции животных снижалось со временем, популяции В-клеток начинали восстанавливаться (см. фиг. 16, например, как наблюдалось на 91 день для животного № I06870 и на 64 день для животного № I06872).

Пример 11. CD3хCD20 биспецифические антитела могут снижать число В-клеток CD20+ в лимфоидных тканях яванских макаков при более низких дозах, чем моноспецифическое антитело

Изменения в уровнях В-клеток CD20+ в лимфоидных тканях яванских макаков исследовали методом FACS после введения анти-CD3хCD20 биспецифического антитела (Антитела 1 или Антитела 4) по сравнению с моноспецифическим анти-CD20 антителом (Контрольное Ab 3 - Ритуксан). Исследование проводили на самцах яванских макаков (*Macaca fascicularis*), распределенных по восьми группам дозирования по 3 животных на группу дозирования, аналогично Группам 1-8 из примера 10, выше. Дозы препарата антитела или базового раствора вводили путем в.в. инфузии, а животных умерщвляли и получали ткани на 7 день после дозирования. Образцы тканей анализировали методом FACS в отношении белых кровяных телец (CD45+) и, в частности, маркеров В-клеток (CD20+), затем определяли % объема В-клеток.

Популяции В-клеток определяли, используя релевантные флуоресцентно меченые антитела (CD20 APC-Су7) и оценку методом FACS, аналогично способу, описанному выше в примере 10. Результаты приведены в табл. 18 и на фиг. 17A и 17B.

Таблица 18. Процент CD20-положительных клеток в обезьяньих брыжеечных лимфатических узлах и селезенке после обработки

		Брыжеечные лимфатические узлы	Селезенка
Обработка	Животное №	День 7	День 7
Плацебо	78	38,14	63,22
	79	38,57	62,79
	80	37,36	49,17
Контрольное Ab 3	81	6,21	4,5
	82	10,3	3,45
	83	4,21	2,18
Ab 4 0,01 мг/кг	84	13,43	3,14
	85	6,88	2,27
	86	10,78	1,39
Ab 4 0,1 мг/кг	87	1,51	2,37
	88	0,45	1,65
	89	1,24	2,4
Ab 4 1 мг/кг	90	0,63	0,97
	91	0,62	1,93
	92	1,08	1,22
Ab 1 0,01 мг/кг	93	5,38	1,22
	94	6,37	1,89
	95	13,25	6,99
Ab 1 0,1 мг/кг	96	0,43	1,55
	97	0,68	1,75
	98	2,36	2,97
Ab 1 1 мг/кг	99	0,33	1,79
	00	1,6	1,71
	01	0,5	1,21

Как показано в табл. 18 и на фиг. 17A, введение CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом приводило к снижению числа тканевых В-клеток в селезенке при более низких дозах (дозах от 0,01 до 1,0 мг/кг) для биспецифических групп. Это снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных.

Как показано в табл. 18 и на фиг. 17B, введение CD3хCD20 биспецифических антител по сравнению с анти-CD20 моноспецифическим антителом приводило к снижению числа тканевых В-клеток в брыжеечных лимфатических узлах при более низких дозах (дозах от 0,01 до 1,0 мг/кг) для биспецифических групп, при этом доза биспецифического антитела 0,1 мг/кг и 1 мг/кг приводила к более эффективному снижению числа В-клеток, чем в моноспецифической группе. Это снижение не наблюдали в контрольной плацебо-группе животных.

Пример 12. Лечение опухолей CD3хCD20 биспецифическим антителом

А. Лечение CD20хCD3 биспецифическим антителом подавляет рост опухолей Raji у мышей NSG

Чтобы оценить эффективность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител в отношении снижения роста опухолей Raji, мышам NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2Rγ^{null}), приобретенным у Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), подкожно имплантировали 2×10⁶ опухолевых клеток Raji и 5×10⁵ человеческих МКПК (день 0). В тот же день мышам обрабатывали внутрибрюшинной дозой 0,4, 0,04 или 0,004 мг/кг на мышь (N=5 мышей на группу обработки) Антитела 1 или Контрольного антитела 5 (антитело IgG1 к нерелевантной мишени), или базовым раствором. Начиная с 0 дня, мышам дважды в неделю обрабатывали внутрибрюшинной дозой препарата или базового раствора в течение оставшегося времени исследования. Объем опухолей измеряли два раза в неделю, используя калиперы, и рассчитывали объем опухоли как: Объем=(длина × ширина²)/2. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 (версия для Macintosh).

Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа

ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Тьюки. Данные по каждому показанию сравнивали среди групп обработки. Статистически значимым считался порог $p < 0,05$.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 7A-7F. Эти результаты показывают, что Антитело 1 (CD3хCD20-химерный Fc) нацелено на опухоли Raji у мышей, которым имплантировали также человеческие иммунные клетки, и приводит к полному подавлению роста опухоли в исследуемых дозах (фиг. 7C: 0,4 мг/кг Ab1; фиг. 7E: 0,04 мг/кг Ab1; фиг. 7F: 0,004 мг/кг Ab1). Этот пример демонстрирует, что обработка CD3хCD20 биспецифическим Антителом 1 была эффективна в отношении ингибирования роста опухолей, начиная со времени имплантации опухолей. Рост опухолей Raji полностью подавлялся до 23 дней после имплантации мышам, которые получали дозы 0,4, 0,04 или 0,004 мг/кг Антитела 1, по сравнению с контролем. Также наблюдали, что ни Антитело 1, ни Контрольное антитело не оказывали значительного влияния на массу тела мышей во время исследования (данные не показаны).

Противоопухолевое действие CD3хCD20 биспецифических антител дополнительно исследовали на сходной мышинной модели NSG (описанной выше), при этом мышам NSG дозировали 1 мг мышинного IgG (mIgG2a Fc) на -1 день и один раз в неделю после этого. Результаты проиллюстрированы на фиг. 8A-8B.

Этот эксперимент демонстрирует, что обработка CD3хCD20 биспецифическим Антителом 1 (CD3хCD20-химерный Fc) или CD3хCD20 биспецифическим Антителом 4 (CD3хCD20-дтFc) была эффективной в отношении ингибирования роста опухолей, начиная со времени имплантации опухолей, в дозах биспецифического Ab, исследуемого в присутствии циркулирующего IgG (фиг. 8A-8B). Как видно на фиг. 8A, Антитело 1 (биспецифическое антитело CD3хCD20-химерный Fc) демонстрирует в этом эксперименте полное подавление роста опухоли в течение периода исследования с или без добавления IgG.

В. Лечение CD20хCD3 биспецифическим антителом уменьшает развившиеся опухоли у мышей NSG

Оценивали эффективность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител в отношении уменьшения развившихся опухолей у мышей NSG. Мышей NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2R γ^{null}) приобретали у Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) и подкожно имплантировали им сингенные по HLA-антигенам опухолевые клетки Raji (2×10^6) и человеческие МПК (5х10⁵) (-15 день). Перед обработкой опухоль давали развиваться в организме-хозяине в течение 15 дней. За день до введения препарата (-1 день) каждую мышшь дозировали дополнительными 5 мг Fc mIgG2a. После этого мышам дозировали 5 мг Fc mIgG2a на мышшь один раз в неделю в течение всего эксперимента (7, 14 день и т.д.). Перед введением препарата мышам распределяли по 2 экспериментальным группам в соответствии с размером опухоли: Группа 1: ~200-400 мм³ или Группа 2: ~500-900 мм³.

После обработки препаратом для каждой мыши отслеживали и записывали размер опухоли на 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21 и 28 день. Размер опухолей измеряли два раза в неделю, используя калиперы, и рассчитывали объем опухоли как: Объем=(длина × ширина²)/2. Наличие опухолей также определяли путем пальпации. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 (версия для Macintosh). Данные по каждому показанию сравнивали среди групп обработки. Результаты проиллюстрированы на фиг. 9 и 10.

а) Группа 1: ~200-400 мм³ опухоли. Начиная с 0 дня, несколько групп по 4 или 5 мышам в каждой обрабатывали указанной дозой препарата или базового раствора один раз в неделю (т.е. на 7, 14 день и т.д.) следующим образом:

- i) Контроль: только базовый раствор
- ii) Контрольное антитело 5, 0,4 мг/кг
- iii) Антитело 1 (CD20хCD3-химерный Fc), 0,4 мг/кг

б) Группа 2: ~500-900 мм³ опухоли. Начиная с 0 дня, несколько групп по 4 мыши в каждой обрабатывали указанной дозой препарата один раз в неделю (т.е. на 7, 14 день и т.д.) следующим образом:

- i) Контрольное антитело 5, 0,4 мг/кг
- ii) Антитело 1 (CD20хCD3-химерный Fc), 0,4 мг/кг

Опухоли полностью регрессировали в группе, которой вводили 0,4 мг/кг Антитела 1 (CD20хCD3-химерный Fc) на 14 день (См. фиг. 9).

В модели с более крупными развившимися опухолями (т.е. Группа 2, ~500-900 мм³), обработка Антителом 1 (CD20хCD3-химерный Fc) (0,4 мг/кг) приводила к полной абляции развившихся опухолей у мышам на 21 день (См. фиг. 10).

Пример 13. CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию МПК in vitro

Способность отобранных CD3хCD20 биспецифических антител и контрольных конструкций стимулировать мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) и индуцировать их пролиферацию оценивали с помощью катализируемой АТФ количественной оценки (CellTiter Glo®). Активация МПК приводит к высвобождению цитокинов, которые запускают клеточную пролиферацию.

Данные по пролиферации получали, используя следующий протокол: Полученные от человека или яванского макака МПК (5х10⁵/лунку) инкубировали с серийными разведениями CD3хCD20 биспецифических антител или контрольного антитела и коммерческого анти-CD28 антитела (человек: 200 нг/мл, яванский макак: 500 нг/мл) в течение 72 ч при 37°C. Количественную оценку клеток проводили с помо-

щью Cell Titer Glo®, а люминесценцию, как показатель жизнеспособности клеток, измеряли с помощью мультиметочного планшет-ридера VICTOR X5 (PerkinElmer), чтобы выявить живые клетки. Жизнеспособность клеток (кратность индукции для стимулированных клеток по сравнению с нестимулированными) определяли, деля люминесценцию стимулированных клеток на базовую люминесценцию нестимулированных клеток, и строили график с помощью программного обеспечения Prism. Результаты обобщены в табл. 19 и на фиг. 18А и 18В.

Таблица 19. EC_{50} для пролиферации МКПК человека и яванского макака, индуцированной анти-CD3хCD20 биспецифическими антителами

Антитело	Пролиферация МКПК человека EC_{50} [М]	Пролиферация МКПК яванского макака EC_{50} [М]
Контрольное Ab 5	ОА	ОА
CD3хCD20-дтFc (Ab 4)	8,427E-12	3,325E-11
Антитело 1	1,163E-10	1,275E-11

Данные представляют собой медианные значения по 3 или более независимым анализам.

ОА=отсутствие активности.

Как показано в табл. 19 и на фиг. 18А-18В, оба CD20хCD3 биспецифических антитела согласно изобретению индуцировали пролиферацию МКПК человека и яванского макака. Антитело 1 индуцировало пролиферацию МКПК человека и яванского макака приблизительно с такой же эффективностью. Контрольное Ab 5 не проявляло активности.

Пример 14. CD20 х CD3 биспецифические антитела опосредуют уничтожение клеток активированными Т-клетками *in vitro*

МКПК человека или яванского макака выделяли в градиенте фиколл-пак или с помощью среды для разделения Lympholyte Mammal соответственно. Выделенные МКПК (1×10^6 клеток/мл МКПК человека или 5×10^6 клеток/мл МКПК яванского макака) активировали в течение 7 и 21 дня соответственно в полной среде (RPMI, дополненная 10% ФБС, 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 292 мкг/мл L-глутамин), содержащей рекомбинантный человеческий IL-2 (30 Е/мл для МКПК человека, 100 Е/мл для МКПК яванского макака) и активирующие Т-клетки гранулы (анти-CD3/CD28 для МКПК человека, анти-CD2/CD3/CD28 для МКПК яванского макака). CD20-экспрессирующие клетки Raji (2×10^6 клеток/мл) метили 8 мкМ кальцеина-АМ в течение 30 мин при 37°C и три раза промывали средой. Меченые кальцеином клетки-мишени (10000-20000 клеток/лунку) высевали в 200 мкл с активированными Т-клетками (соотношение эффекторных клеток:клетки-мишени 10:1) и серийными разведениями Антитела 1, Ab 4 или Контрольного Ab 5 (диапазон концентраций для человека: от 2 до 0,00003 нМ; диапазон концентраций для яванского макака: от 6,6 нМ до 0,002 пМ) в полной среде в течение 2 ч при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали, а супернатанты переносили в пропускающий свет черный планшет с прозрачным дном для проведения флуоресцентного анализа. Процент цитотоксичности рассчитывали, используя уравнение:

$$\% \text{ цитотоксичности} = ((FS - FSR) / (FMR - FSR)) * 100\%,$$

где FS - высвобождение кальцеина из исследуемой лунки, FSR - спонтанное высвобождение кальцеина, а FMR максимальное высвобождение кальцеина из клеток, лизированных Тритон-Х.

EC_{50} жизнеспособности клеток (катализируемая АТФ количественная оценка) определяли с помощью программного обеспечения Prism. Лизис клеток (цитотоксичность) оценивали по высвобождению кальцеина как долю максимального высвобождения. Процент клеточной цитотоксичности рассчитывали как наблюдаемое высвобождение в сравнении с максимальным высвобождением и определяли значения EC_{50} . Результаты приведены в табл. 20 и на фиг. 19А (человеческие Т-клетки) и 19В (обезьяньи Т-клетки).

Таблица 20. Значения EC_{50} для CD3хCD20-индуцированной цитотоксичности в отношении клеток Raji

Антитело	Цитотоксичность Raji, активированные Т-клетки человека [М]	Цитотоксичность Raji, активированные Т-клетки обезьяны [М]
Контрольное Ab 5	ОА	НИ
CD3хCD20-дтFc (Ab 4)	1,571E-11	1,730E-12
Антитело 1	2,503E-11	9,104E-12

ОА=Отсутствие активности;

НИ=не исследовано.

Как показано в табл. 20, Антитело 1 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC_{50} 25,0 и 9,10 пМ для Т-клеток человека (фиг. 19А) и яванского макака (фиг. 19В) соответственно. Антитело 4 опосредовало целевое уничтожение клеток с типовыми значениями EC_{50} 15,7 пМ и 1,73 пМ для Т-клеток человека (фиг. 19А) и яванского макака (фиг. 19В) соответственно. Для контрольного антитела активности не наблюдали.

Чтобы исследовать специфическое уничтожение CD20-несущих клеток-мишеней методом проточной цитометрии, родительские клетки мышинной миеломы B16F10.9 (которые не экспрессируют CD20) и клетки B16F10.9, сконструированные так, чтобы стабильно экспрессировать человеческий CD20 (B16F10.9/CD20), метили 1 мкМ флуоресцентных красителей-"свидетелей" -сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFDA-SE) и Violet Cell Tracker соответственно. После мечения клетки смешивали в соотношении 1:1 и высевали на ночь при 37°C. Человеческие МКИК отдельно высевали в дополненную среду RPMI при 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C, чтобы достичь обогащения лимфоцитами путем снижения числа адгезивных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки-мишени инкубировали вместе с адгезивными, обедненными в отношении клеток наивными МКИК (соотношение эффекторные клетки:клетки-мишени 4:1) и серийными разведениями исследуемых CD3хCD20 биспецифических антител или Контрольного IgG1 антитела 5 (диапазон концентраций: от 66,7 нМ до 0,25 пМ) в течение 48 ч при 37°C. Клетки удаляли из клеточных культуральных планшетов, используя не содержащий ферментов буфер для диссоциации клеток, и анализировали методом FACS. Для анализа FACS клетки окрашивали far red cell tracker для мертвых/живых клеток (Invitrogen). Для оценки специфичности уничтожения проводили гейтинг клеток на живых популяциях, меченых Violet и CFDA-SE. Процент каждой популяции использовали для расчета скорректированной выживаемости следующим способом:

Скорректированная выживаемость=(R1/R2)*100, где

R1=[(B16F10.9/CD20)/фоновые клетки (B16F10.9)]*100 в отсутствие антитела, а

R2=то же самое соотношение, но в присутствии исследуемого антитела.

Таблица 21. Значения EC_{50} для специфического уничтожения мишеней для клеток B16F10.9/CD20

Антитело	% Выживаемости клеток B16F10.9/CD20 [M]
Контрольное Ab 5	ОА
CD3хCD20-дтFc (Ab 4)	1,282E-11
Антитело 1	1,952E-11

ОА=Отсутствие активности.

Как CD3хCD20-химерный Fc (Антитело 1), так и CD3хCD20-дтFc (Антитело 4) специфическим образом направляли человеческие Т-клетки для уничтожения только клеток-мишеней, экспрессирующих CD20 (фиг. 20А-В), в смешанной популяции клеток. Целевое уничтожение клеток наблюдали только в присутствии биспецифического антитела, при этом число клеток B16F10.9/CD20 снижалось дозозависимым образом Антителом 1 (EC_{50} 19,5 пМ) и Антителом 4 (EC_{50} 12,8 пМ) (фиг. 20В). Менее 5% CD20-экспрессирующих клеток оставались живыми при наибольшей исследуемой дозе (10 мкг/мл) (фиг. 20В). Никаких свидетельств гибели клеток не наблюдали в популяции родительских клеток B16F10.9 или в популяции B16F10.9/CD20 при применении Контрольного Ab 5, контрольного IgG1 антитела.

Пример 15. CD3хCD20 биспецифическое антитело оказывает повышающую регуляцию на ранний маркер активации CD69 на Т-клетках в 20-часовом *in vitro* анализе FACS

CD69+ является одним из наиболее ранних индуцибельных маркеров клеточной поверхности, который свидетельствует об активации Т-клеток. Активацию Т-клеток можно определить, исследуя повышение регуляции специфических маркеров клеточной поверхности, таких как CD69.

Способность CD3хCD20 биспецифического антитела оказывать повышающую регуляцию на ранний маркер активации CD69 на Т-клетках человека или яванского макака в цельной крови определяли с помощью 20-часового *in vitro* анализа FACS. Вкратце, активацию Т-клеток оценивали, инкубируя свежее выделенную цельную кровь человека или яванского макака (100 мкл) в плоскодонных 96-луночных планшетах с 5-кратными (человек) или 10-кратными (яванский макак) серийными разведениями Антитела 1, Антитела 4 или Контрольного Ab 5 (диапазон концентраций: от 50 нМ до 0,0006 нМ) в RPMI+L-глутамате с конечным объемом 200 мкл в течение 20 ч при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин и удаляли плазму. Чтобы определить повышение регуляции CD69 на Т-клетках, коктейль для фенотипирования, содержащий напрямую конъюгированные антитела к CD2 и CD69, а также CD45, CD4, CD8 и CD19 (человек) или CD16 (яванский макак), добавляли непосредственно в кровь в течение 30 мин при 4°C. Красные кровяные тельца лизировали в течение 15 мин с помощью 1,5 мл буфера PharmLyse, следуя инструкциям производителя. Клетки дважды промывали, пересуспендировали в 200 мкл охлажденного ФСБ+1% ФБС и анализировали методом проточной цитометрии, используя цитометр BD FACSCanto. Т-клетки CD4+ идентифицировали, проводя сначала гей-

тинг на жизнеспособных малых лимфоцитах CD45+, а затем - гейтинг на Т-клетках CD19-/CD2+/CD4+ (человек) или Т-клетках CD16-/CD2+/CD4+ (яванский макак).

Представлен процент активированных (CD69+) Т-клеток в общем количестве эффекторных клеток CD2+. См. табл. 22, а также фиг. 21. Результаты показывают, что CD3хCD20 биспецифические антитела значительно активировали Т-клетки, о чем свидетельствует ранний маркер активации CD69.

Таблица 22. Значения EC₅₀ для специфического уничтожения мишеней для клеток B16F10.9/CD20

Антитело	% Активированных Т-клеток (CD69+) [M]
Контрольное Ab 5	ОА
CD3хCD20-дтFc (Ab 4)	7,907E-11
CD3хCD20-химерный Fc (Антитело 1)	1,560E-11

ОА=Отсутствие активности.

Пример 16. CD3хCD20 биспецифические антитела индуцируют кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями

Для определения того, что CD3хCD20 биспецифическое антитело связывало Т-клетки с клетками-мишенями (клетками CD20+) с помощью своих связывающих плеч, применяли формат кластеризации клеток. Эффекторные клетки предварительно окрашивали CFSE, а клетки CD20+ предварительно окрашивали Violet Cell Tracker в течение 24 ч и проводили гейтинг на отдельные квадранты после инкубации с нерелевантным контрольным антителом (Контрольное антитело 5, нерелевантное антитело изотипа IgG1). См. фиг. 22А, которая демонстрирует отсутствие кластеризации (двойного окрашивания) в смеси клеток в случае обработки нерелевантным антителом. После инкубации с CD3хCD20 биспецифическим антителом проявлялись клеточные кластеры благодаря окрашиванию CFSE и Violet (см. фиг. 22В, в верхнем левом квадранте на графике рассеяния, область, выделенная жирным квадратом).

Пример 17. Экспрессия ингибиторных маркеров Tim-3 и PD-1 на клетках CD3+

Т-клеточная дисфункция или истощение проявляется в несущих опухоль организмах-хозяевах. Было определено, что рецепторы Tim-3 и PD-1 являются маркерами истощения Т-клеток при хронических болезненных состояниях. Согласно исследователям Sakuishi, K. et al. (J. Exp. Med. 207 (10): 2187-2194, 2010), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), являющиеся положительными в отношении Tim-3 и PD-1 (Tim-3+PD-1+TIL), демонстрируют наиболее тяжелый истощенный фенотип, определяемый отсутствием пролиферации и выработки IL-2, TNF и IFN-γ.

CD3-положительные клетки выделяли из крови и опухолей мышей NSG, которым подкожно имплантировали сингенные по HLA-антигенам опухолевые клетки Raji и человеческие МКПК - смотрите пример 12В, выше. Вкратце, опухолям давали развиваться в организме-хозяине в течение 15 дней перед обработкой, затем мышей разделяли на две группы обработки на основании размера опухолей (смотрите пример 12В). Кровь получали на 9 день от обработанных (биспецифическое Ab) и необработанных мышей из каждой исследуемой группы, т.е. Группы 1, ~200-400 мм³ или Группы 2, ~500-900 мм³. Необработанных мышей (базовый раствор или Контрольное Ab), имеющих опухоли, достигающие 1500 мм³, умерщвляли в конце исследования, а эти опухоли исследовали в отношении экспрессии PD1 и Tim-3.

Для экспериментов по оценке циркулирующих Т-клеток отбирали фракции Т-клеток CD45+CD3+ для определения маркеров с применением напрямую меченых антител к Tim-3 или PD-1 (доступных на коммерческой основе от Biolegend). Клетки Tim-3+PD-1+ составляли преобладающую фракцию циркулирующих Т-клеток в крови необработанных животных. При этом Т-клетки в крови обработанных CD20хCD3 биспецифическим антителом (Ab 1) животных демонстрировали меньшие фракции клеток Tim-3+PD-1+.

Опухолевые клетки от необработанных хозяев разделяли и окрашивали для оценки жизнеспособности. Анализ FACS проводили для жизнеспособных одиночных клеток, чтобы отсортировать фракции клеток CD45+CD3+, которые затем исследовали в отношении экспрессии Tim-3 или PD-1.

Мы обнаружили, что ингибиторные рецепторы Tim-3 и PD-1 экспрессировались на CD3+ TIL в В-клеточных лимфомах NSG необработанных мышей, во время экспериментов, описанных в примере 12В, а клетки Tim-3+PD-1+ являлись преобладающей фракцией инфильтрирующих опухоль Т-клеток.

Пример 18. Обработка CD3 х CD20 биспецифическим антителом является более эффективной по сравнению с анти-CD20+ антителом у мышей NSG с развившимися опухолями Raji

Оценивали эффективность отобранных анти-CD3хCD20 биспецифических антител в отношении уменьшения развившихся опухолей у мышей NSG. Мышам NSG (мыши NOD/LtSz-scid/IL2R^γnull; Jackson Laboratories) подкожно имплантировали опухолевые клетки Raji (2х10⁶) и человеческие МКПК (5х10⁵) (на -14 день) (аналогично с примером 12В).

CD20хCD3 биспецифическое Ab1 (в дозе 0,4 мг/кг; 2х/неделю, в.б.) было сравнимо с CD19хCD3 BiTE (в дозе 0,5 мг/кг; 5х/неделю, в.в.) (фиг. 23) и превосходило терапию ритуксимабом (в дозе 8 мг/кг; 5х/неделю, в.б.) (фиг. 24) в подавлении развившихся опухолей Raji.

Пример 19. Лечение меланомы CD3 x CD20 биспецифическим антителом

Исследователи установили, что некоторые субпопуляции меланомного рака у пациентов, такие как опухолевые клетки меланомы CD20+, могут проявлять опухоль-инициирующие характеристики и повышенный риск повторного появления заболевания (Pinc et al. Mol Ther. 20 (5):1056-1062, 2012, epub 2012 Feb 21). CD20xCD3 биспецифическое антитело Ab1 демонстрировало высокую активность против других опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, так как оно значительно замедляло рост hCD20-трансдуцированной опухоли B16F10.9 (B16F10.9/CD20) у иммунокомпетентных мышей.

Пример 20. Клиническое исследование фазы 1 для изучения безопасности и переносимости анти-CD20xCD3 биспецифического моноклонального антитела у пациентов со злокачественными CD20+ В-клеточными образованиями, которые ранее проходили терапию CD20-направленным антителом

Цели исследования и обзор исследования

Первичной целью настоящего исследования является оценка безопасности, переносимости и доз-лимитирующей токсичности (ДЛТ) вводимого внутривенно анти-CD20xCD3 биспецифического моноклонального антитела. Применяемым в настоящем исследовании анти-CD20xCD3 биспецифическим моноклональным антителом было антитело, называемое в данном документе "Ab1".

Вторичными целями исследования являются: (а) получение характеристик фармакокинетического (ФК) профиля Ab1; (б) оценка иммуногенности Ab1; (с) исследование предварительной противоопухолевой активности Ab1, вводимого пациентам со злокачественными CD20+ В-клеточными образованиями (неходжкинская лимфома [НХЛ] и хронический лимфоцитарный лейкоз [ХЛЛ]), которые ранее проходили терапию анти-CD20 антителом.

Определенные поисковые цели исследования состояли в оценке биомаркеров, которые могут коррелировать с механизмом действия, наблюдаемой цитотоксичностью и потенциальной противоопухолевой активностью, включая, но не ограничиваясь этим: анализ цитокинов, фенотипирование подгрупп В-клеток и Т-клеток периферической крови и иммунное фенотипирование, а также изменения в генной экспрессии в периферической крови.

Дизайн исследования

Проводили открытое, многоцентровое исследование с повышением дозы с анти-CD20xCD3 моноклональным антителом "Ab1", вводимым посредством ВВ инфузии. Пациентам приписывали определенный уровень дозирования (УД), состоящий из начальной дозы, за которой следуют более высокие дозы для второго и последующих введений. Пациентов отбирали на основании показаний (НХЛ или ХЛЛ). Каждому УД соответствуют 2 группы (по одной для каждого показания) с 3-6 пациентами на группу.

Пациентов, которые сначала демонстрируют улучшение клинических показателей, но после этого случается рецидив или прогрессирование заболевания, можно повторно лечить Ab1 при наивысшем УД, который считается переносимым во время рецидива или прогрессирования.

Пациенты, уже отобранные для исследования, проходили процедуры проверки, чтобы определить их соответствие критериям, в течение 28 дней перед начальным введением Ab1. Пациентов отбирали последовательно на основании показаний (НХЛ или ХЛЛ) с целью подтверждения соответствия спонсором до тех пор, пока каждая группа не заполнялась согласно протоколу.

Для НХЛ и ХЛЛ были созданы отдельные независимые группы с повышением дозы при каждом УД. Каждый УД состоял из начальной дозы и второй и последующей дозы, которые превышают стартовую дозу, при условии, что начальная доза была переносимой.

Повышение дозы соответствовало традиционному дизайну повышения дозы 3+3. На основании наблюдаемой токсичности планировали включение в группу от трех до 6 пациентов.

После завершения фазы повышения дозы и после определения рекомендуемой дозы для дополнительного исследования планировали создание 3 расширенных групп с нечувствительной НХЛ, агрессивной НХЛ и ХЛЛ, по 10 пациентов в каждой расширенной группе.

При первом УД необходим 48-часовой период ожидания между введениями препарата в начальном исследовании для первых 3 пациентов в пределах одного показания. Следующих пациентов при первом УД не лечат в тот же день, вне зависимости от показаний. В следующих группах, при условии отсутствия неожиданной токсичности в предыдущих группах или в пределах группы, начальные инфузии для первых 3 пациентов следует проводить с разницей по меньшей мере в 24 ч.

После того, как для каждой группы пациентов завершается отбор, лечение и период наблюдения ДЛТ, открытие следующих групп УД для отбора (или расширение текущих групп УД) определяют после изучения данных по безопасности спонсором и исследователем(ями). Период наблюдения ДЛТ определяют как первые 28 дней лечения, что в данном исследовании соответствует индукционному периоду. Во время индукции пациентов лечат 4 еженедельными введениями Ab1.

Чтобы можно было оценить ДЛТ, отдельный пациент должен получить по меньшей мере 2 первых введения Ab1 (неделя 1, день 1 и неделя 2, день 1). Кроме того, пациента необходимо наблюдать по меньшей мере в течение 28 дней после первого введения и по меньшей мере 21 день после второго введения.

Продолжительность исследования

Период лечения составляет 6 месяцев. Сначала пациентов лечат, применяя до 9 доз Ab1-4 ежене-

дельные дозы в течение 4-недельного индукционного периода, за которыми следуют 5 доз, вводимых ежемесячно в течение 5-месячного поддерживающего периода. Период наблюдения составляет 6 месяцев.

Популяция пациентов

До 84 пациентов может требоваться в группах с повышением дозы для обоих показаний (НХЛ и ХЛЛ) во время фазы повышения дозы (исходя из того, что в каждую группу от УД1 до УД7 включено по 6 пациентов), дополнительные 36 пациентов могут быть включены при добавлении групп УД8-УД10 и до 30 дополнительных пациентов (20 НХЛ [по 10 для невосприимчивой и агрессивной НХЛ] и 10 ХЛЛ) могут быть требоваться в расширенных группах, всего 150 пациентов.

Пациенты должны быть такими, кто имеет подтвержденные злокачественные CD20+ В-клеточные образования, при этом заболевание должно быть невосприимчивым к предыдущей терапии, кто ранее проходил терапию CD20-направленным антителом, для которых отсутствуют стандартные варианты лечения и для которых может подходить лечение анти-CD20 антителом.

Критерии включения в исследование следующие: (1) наличие подтвержденного злокачественного CD20+ В-клеточного образования, при этом заболевание должно быть невосприимчивым к предыдущей терапии, отсутствие стандартных вариантов лечения и целесообразность лечения анти-CD20 антителом; (2) прохождение ранее терапии анти-CD20 антителом; (3) все пациенты (В-клеточная НХЛ и ХЛЛ) должны иметь по меньшей мере двумерно измеряемое поражение $\geq 1,5$ см), подтвержденное КТ-сканированием; (4) пациенты с ХЛЛ должны иметь белые кровяные тельца (БКТ) $\leq 200 \times 10^9$; (5) возраст ≥ 18 лет; (6) общее состояние по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) ≤ 1 ; (7) ожидаемая продолжительность жизни по меньшей мере 6 месяцев; (8) нормальная функция костного мозга, подтвержденная: (а) числом тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9$ /л, (b) уровнем гемоглобина ≥ 9 г/дл и (с) АЧН $\geq 1 \times 10^9$ /л; (9) нормальная органная функция; (10) согласие пройти в обязательном порядке предварительную процедуру биопсии опухоли, если с точки зрения исследователя пациент имеет поддающееся оценке поражение, биопсию которого можно получить без значительного риска для пациента; (11) желание и возможность соблюдать посещение клиники и связанные с исследованием процедуры; и (12) предоставление подписанного информированного согласия.

Критерии исключения из исследования следующие:

- (1) первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС) или известное или подозреваемое поражение ЦНС непервичной НХЛ ЦНС;
- (2) анамнез или текущая релевантная патология ЦНС, такая как (а) эпилепсия, пароксизм, парез, афазия, апоплексия, тяжелые поражения головного мозга, мозжечковое заболевание, органический мозговой синдром, психоз или (b) свидетельства наличия воспалительных поражений и/или васкулита при МРТ головы;
- (3) стандартная противолимфомная химиотерапия (небиологическая) или лучевая терапия в пределах 28 дней до первого введения исследуемого препарата;
- (4) предыдущая терапия блинатумомабом;
- (5) трансплантация аллогенных стволовых клеток;
- (6) лечение ритуксимабом, алемтузумабом или другим исследовательским или коммерческим биологическим агентом в пределах 12 недель до первого введения исследуемого препарата [ВНИМАНИЕ: для пациентов с агрессивной лимфомой, для которых требуется незамедлительное лечение, период отмычки может быть сокращен до 28 дней];
- (7) иммуносупрессивная терапия (отличная от биологической) в пределах 28 дней от первого введения исследуемого препарата;
- (8) лечение экспериментальным неббиологическим агентом в пределах 28 дней от первого введения исследуемого препарата;
- (9) анамнез аллергических реакций, вызываемых соединениями со сходным химическим или биологическим составом с исследуемым препаратом;
- (10) анамнез гиперчувствительности к любому соединению из группы тетрациклиновых антибиотиков;
- (11) анамнез злокачественных образований, отличных от В-клеточных злокачественных образований, в пределах 5 лет до начала исследования за исключением резецированной/удаленной базальной или плоскоклеточной карциномы кожи или карциномы in situ шейки матки;
- (12) наличие бактериальной, вирусной, грибковой или микобактериальной или другой инфекции или любого серьезного эпизода инфекции, требующего госпитализации или лечения ВВ противомикробными средствами в пределах 4 недель до первого введения;
- (13) свидетельства наличия серьезного параллельного заболевания или патологического состояния, которое может помешать проведению исследования или подвергнуть пациента значительному риску;
- (14) текущее системное лечение кортикостероидами за исключением применения кортикостероидов по другим (не опухолевым и не иммуносупрессивным) показаниям, максимум до 5 мг/день преднизона или его эквивалента;

(15) инфекция вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или хроническая инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) или вирусом гепатита С (ВГС);

(16) наличие гиперчувствительности к аллопуринолу и расбуриказе;

(17) беременные или кормящие грудью женщины;

(18) сексуально активные мужчины или женщины, способные к деторождению, не желающие пользоваться адекватной контрацепцией во время исследования.

Варианты лечения

Ab1 поставлялось в виде жидкости в стерильных одноразовых флаконах. Каждый флакон содержит изымаемый объем 1 мл Ab1 в концентрации 2 мг/мл. Подробные инструкции по приготовлению и введению будут предоставлены на месте в фармацевтических руководствах.

Начальная доза Ab1 при уровне дозирования (УД) 1 составляла 30 мкг; дозы могут повышаться до 8000 мкг при достижении УД10. Дозы Ab1 вводили включенным в исследование пациентам в амбулаторных условиях путем ВВ инфузии в течение по меньшей мере 60 минут. Уровни дозирования приведены в табл. 23.

Таблица 23. Повышение дозы и группы для пациентов с НХЛ и ХЛЛ

Уровень дозирования	Начальная доза (мкг)	2-ая и последующая доза (мкг)	Показание: НХЛ	НХЛ: (n)	Показание: ХЛЛ	ХЛЛ: (n)
УД-1	10	30	Группа 1Н*	3-6	Группа 1Х*	3-6
УД1	30	100	Группа 1Н	3-6	Группа 1Х	3-6
УД2	100	300	Группа 2Н	3-6	Группа 2Х	3-6
УД3	300	1000	Группа 3Н	3-6	Группа 3Х	3-6
УД4	1000	2000	Группа 4Н	3-6	Группа 4Х	3-6
УД5	2000	3000	Группа 5Н	3-6	Группа 5Х	3-6
УД6	3000	4000	Группа 6Н	3-6	Группа 6Х	3-6
УД7	4000	5000	Группа 7Н	3-6	Группа 7Х	3-6
УД8**	5000	6000	Группа 8Н	3-6	Группа 8Х	3-6
УД9**	6000	7000	Группа 9Н	3-6	Группа 9Х	3-6
УД10**	7000	8000	Группа 10Н	3-6	Группа 10Х	3-6

*Н=НХЛ;

Х=ХЛЛ;

УД=Уровень дозирования

** Уровни дозирования 8-10 можно открывать при завершении УД7, МПД не определена, а ФК, ФД и клинические параметры свидетельствуют о том, что оптимальная биологическая доза может быть выше, чем изначально предполагалось.

Пациенты получали Ab1 еженедельно в течение 4-недельного индукционного периода, за которым следовали ежемесячные дозы в количестве 5 дополнительных доз, в дозировке, соответствующей группе.

Конечные точки

Первичной конечной точкой является безопасность (в частности, нежелательные явления [НЯ] и ДЛТ) для определения максимальной переносимой дозы (МПД) и/или оптимальной биологической дозы (ОБД) в качестве рекомендуемой дозы для фазы 2 (РДФ2) Ab1.

Вторичными конечными точками являются:

(а) фармакокинетика: концентрация Ab1; (b) иммуногенность: анти-Ab1 антитела; (с) противоопухолевая активность, включая общий уровень ответа (ОУО), выживаемость без прогрессирования (ВБП) и общая выживаемость (ОВ), а также минимальное остаточное заболевание (МОЗ) для пациентов с ХЛЛ. В отношении ОУО оценку ответа опухоли проводят согласно Пересмотренным критериям ответа для злокачественных лимфом международной рабочей группы Национального института рака (NCI-WG) и согласно руководству по диагностике и лечению ХЛЛ Международного семинара по хроническому лимфоцитарному лейкозу.

Поисковые конечные точки настоящего исследования включают фармакодинамические (ФД) измерения, включая: (а) подгруппы и фенотип В-клеток и Т-клеток, (b) уровни циркулирующих цитокинов и (с) С-реактивный белок (CRP).

Процедуры и оценки

Контрольные процедуры включают МРТ головного мозга, электрокардиограмму (ЭКГ), исследование на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита С (ВГС) и вирус гепатита В (ВГВ) и свертываемость крови.

Процедуры безопасности включают анамнез, физическое обследование, оценку В-симптомов, оценку общего состояния, клинические лабораторные исследования, жизненно важные функции, НЯ и сопут-

ствующие лекарственные препараты.

Процедуры эффективности включают оценку опухолей, включая КТ-сканирование, позитронно-эмиссионную томографию с ^{18}F -фтордезоксиглюкозой (ПЭТ-ФДГ), аспираты и биопсию костного мозга, биопсию лимфатических узлов и/или опухолей и образцы периферической крови (только для пациентов с ХЛЛ).

Образцы крови для оценки ФК и антитела против препарата (АПП) получали для включенных в исследование пациентов.

Образцы биомаркеров получали для включенных в исследование пациентов, чтобы отслеживать изменения в выработке цитокинов, сывороточных уровнях провоспалительных цитокинов и изменения в подгруппах лимфоцитов и статусе активации. Кроме того, эти образцы позволяют проводить анализ опухолей или соматический генетический анализ для вариаций, которые влияют на клиническое течение первопричинного заболевания или модулирует побочные эффекты лечения.

Подразумевается, что настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными описанными в данном документе вариантами реализации. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение тем, что описаны в данном документе, станут очевидны для специалистов в данной области техники после изучения вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или уменьшения интенсивности CD20-положительного В-клеточного рака у субъекта, включающий применение протокола, подразумевающего повышение дозы, который снижает действие цитокинового каскада, где протокол, подразумевающий повышение дозы, включает введение первой дозы биспецифического антитела и затем введение второй дозы указанного биспецифического антитела, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу,

при этом биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD20, и константную область тяжелой цепи, связанную с каждым из первого и второго антигенсвязывающих доменов, где константная область тяжелой цепи содержит:

(a) аминокислотную последовательность нижней шарнирной области человеческого IgG2, содержащую RCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) от позиции 228 до 236 (нумерация EU);

(b) аминокислотную последовательность верхней шарнирной области человеческого IgG1 или человеческого IgG4 от позиции 216 до 227 (нумерация EU);

(c) аминокислотную последовательность CH2-домена человеческого IgG4 от позиции 237 до 340 (нумерация EU);

(d) CH1-домен человеческого IgG1 и CH3-домен человеческого IgG1 или CH1-домен человеческого IgG4 и CH3-домен человеческого IgG4;

где биспецифическое антитело проявляет более высокую аффинность связывания в отношении человеческого FcγRIIA по сравнению с человеческим FcγRIIB, и проявляет слабую или не определяемую аффинность связывания с человеческим FcγRI и человеческим FcγRIII, как измерено методом поверхностного плазмонного резонанса.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что В-клетки представляют собой пре-В-лимфоциты, зрелые В-лимфоциты или клетки В-клеточной неходжкинской лимфомы.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что субъекта выбирают на основании наличия остаточного рака.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому или лейкоз.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: фолликулярной лимфомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточной лимфобластной лимфомы, ходжкинской лимфомы, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза и лимфомы Беркитта.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что первая доза составляет вплоть до 1000 мкг.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что субъект поражен опухолью, которая устойчива или не полностью восприимчива к (a) терапии одним анти-CD20 моноспецифическим антителом или (b) монотерапии ритуксимабом.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что субъект проходил терапию анти-CD20 моноспецифическим антителом по меньшей мере за 1 день - 1 год перед введением биспецифического антитела.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что константная область тяжелой цепи содержит:

(a) аминокислотную последовательность химерной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA

(SEQ ID NO: 53); или

(b) аминокислотную последовательность химерной шарнирной области ESKYGPPCPPPCAPPVA (SEQ ID NO: 54).

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что:

(a) первый антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 10;

(b) первый антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 18;

(c) второй антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 2;

(d) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 18;

(e) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 2, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 18;

(f) первый антигенсвязывающий домен (A1) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), причем

(i) A1-HCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(ii) A1-HCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(iii) A1-HCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(iv) A1-LCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) A1-LCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и

(vi) A1-LCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

(g) второй антигенсвязывающий домен (A2), который специфически связывает человеческий CD20, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3), причем

(i) A2-HCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) A2-HCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(iii) A2-HCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(iv) A2-LCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) A2-LCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и

(vi) A2-LCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

11. Способ по любому из пп.1-9, где

первый антигенсвязывающий домен (A1), который специфически связывает человеческий CD3, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2, A1-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2, A1-LCDR3), а второй антигенсвязывающий домен (A2), который специфически связывает человеческий CD20, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3); причем

(i) A1-HCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(ii) A1-HCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(iii) A1-HCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(iv) A1-LCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) A1-LCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

(vi) A1-LCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(vii) A2-HCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(viii) A2-HCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(ix) A2-HCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(x) A2-LCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(xi) A2-LCDR2 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и

(xii) A2-LCDR3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

12. Способ по п.11, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), которая представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (ii) вариабельную область легкой цепи (LCVR), которая представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD20, содержит (iii) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), которая представляет собой аминокислотную последовательность

ность SEQ ID NO:2, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), которая представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Конструирование химерной шарнирной области

Верхняя шарнирная область													Нижняя шарнирная область												
IgG1, Нумерация EU	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227													
IgG1, Нумерация Кабата	226	227	228	232 ^a 229 ^b	233 ^a 230 ^b	234 ^a 232 ^b	235	236	237	238	239	240													
IgG1	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	IgG2	P	C	P	A	P	P	V	A				
IgG4	E	S	K	Y	G	--	--	--	P	P	C	P													
IgG4, Нумерация EU	216	217	218	- ^a 219 ^a	- ^a 220 ^a				224	225	226	227	IgG2, Нумерация EU	228	229	230	231	232	233	234	235				
IgG4, Нумерация Кабата	226	227	228	229	230				237	238	239	240	IgG2, Нумерация Кабата	241	242	243	244	245	246	247	248				

-- означает отсутствие соответствующего номера
-- означает отсутствие соответствующей аминокислоты
^a нумерация в соответствии с последним обновлением IMGT Scientific Chart, (IMGT®, международная иммуногенетическая информационная система®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, созданный: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.
^b нумерация в соответствии с индексом EU, описанная у Кабата (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)

Фиг. 1

10 20 30 40 50 60
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
←CH1 Верхняя/нижняя шарнирная область→ CH2→
70 80 90 100 110 120
GLYSLSVVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKHTTCP PCFAPELLGQ
130 140 150 160 170 180
PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
CH3→
190 200 210 220 230 240
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
250 260 270 280 290 300
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPVV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
310 320 330
QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Константная область тяжелой цепи
человеческого IGHG1 UniProtKB/Swiss-Prot
Accn. № P01857 (SEQ ID NO:45)

Фиг. 2

10 20 30 40 50 60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
←CH1 Верхняя/нижняя шарнирная область→ CH2→
70 80 90 100 110 120
GLYSLSVVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKTVER KCCVECPPCP APPVAGPSVF
130 140 150 160 170 180
LFPPKPKDITL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR
CH3→
190 200 210 220 230 240
VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
250 260 270 280 290 300
QVSLTCLVKG FYPDSISVEW ESNQGPENNY KTTFPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
310 320
VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Константная область тяжелой цепи
человеческого IGHG2 UniProtKB/Swiss-Prot
Accn. № P01859 (SEQ ID NO:46)

Фиг. 3

102030405060

ASTKGPVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

708090100110120

GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDPKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV

130140150160170180

FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

190200210220230240

RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPFSQEEMTK

250260270280290300

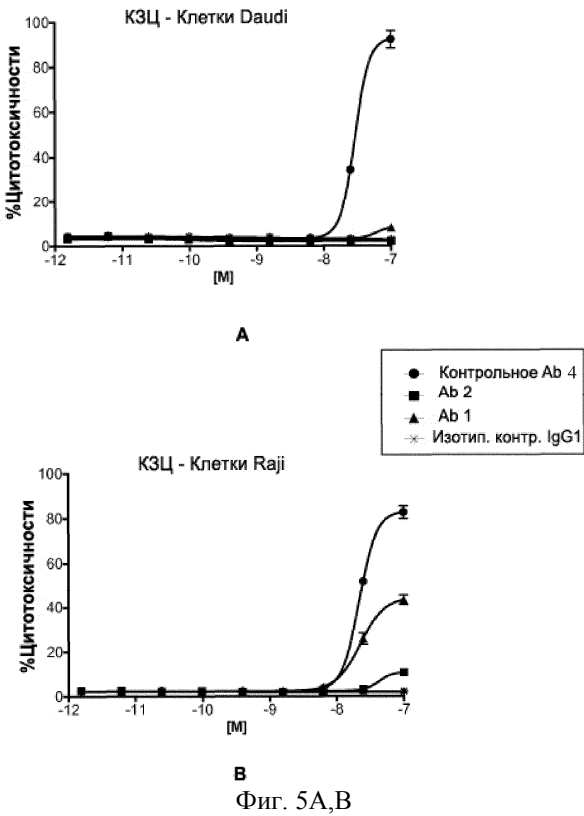
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

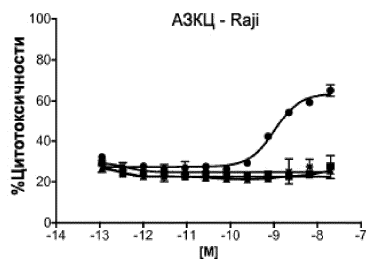
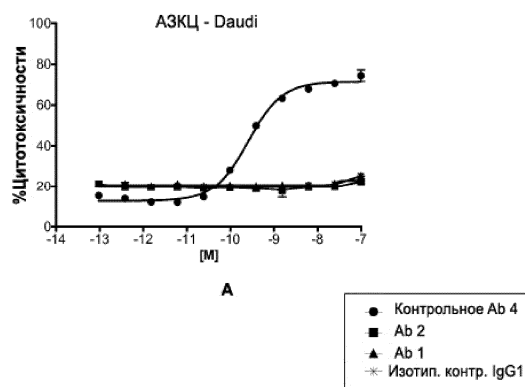
310320

NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK

CH1Верхняя/нижняя шарнирная областьCH2CH3

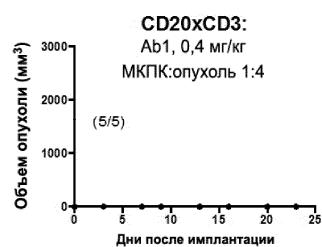
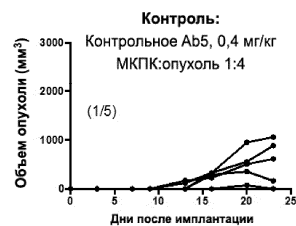
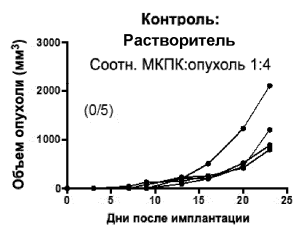
Константная область тяжелой цепи
человеческого IGHG4 UniProtKB/Swiss-Prot
Accn. № P01861 (SEQ ID NO:47)
Фиг. 4



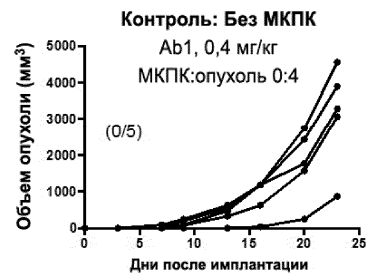


Фиг. 6А,В

Лечение Ab1 или Контролем мышей NSG, которым имплантировали опухолевые клетки Raji и МКПК

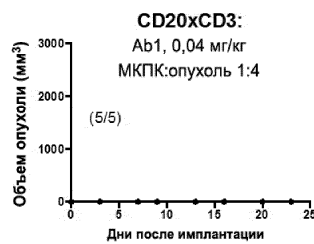


Лечение мышей NSG, которым имплантировали опухолевые клетки Raji без МКПК-контроля, с помощью Ab1

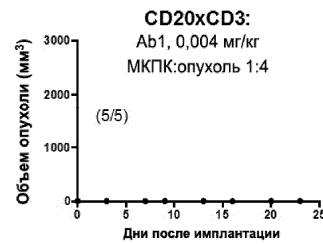


D

Лечение мышей NSG, которым имплантировали опухолевые клетки Raji и МКПК, с помощью Ab1



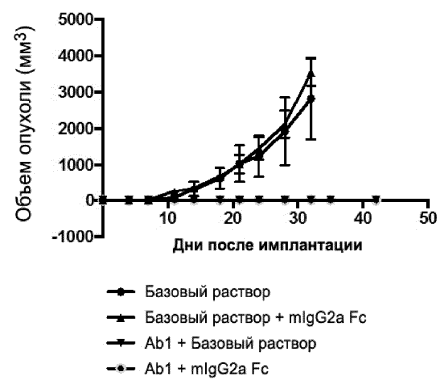
E



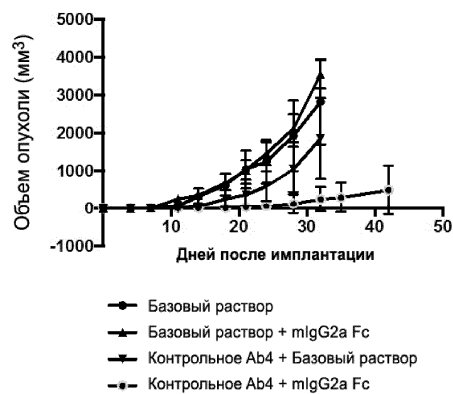
F

Фиг. 7A-F

Мыши NSG с добавлением mIgG2a Fc



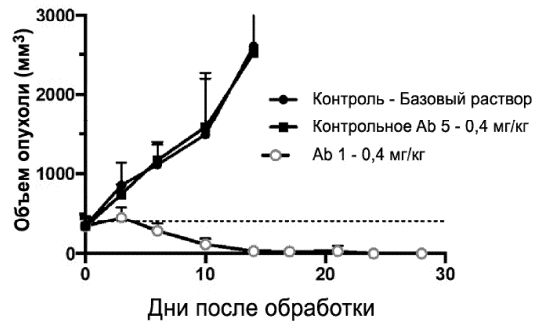
A



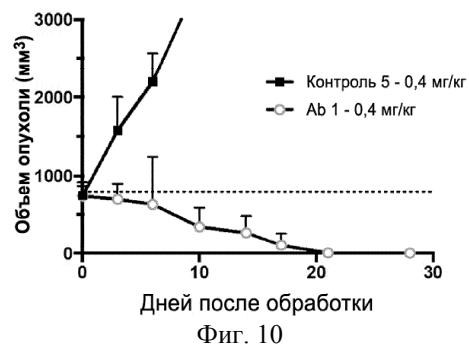
B

Фиг. 8A,B

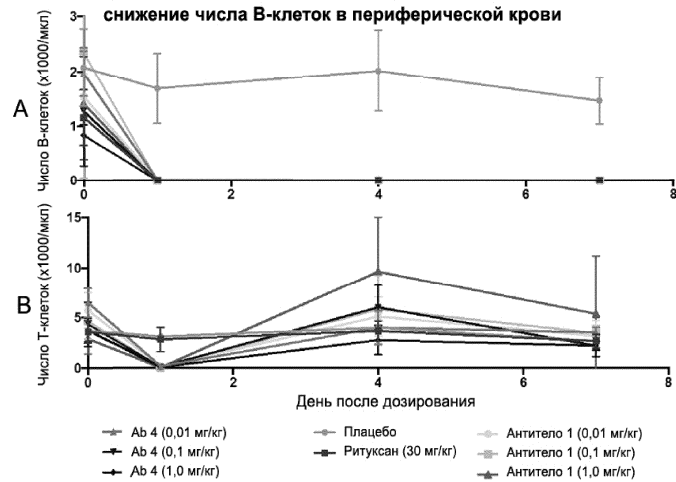
Обработка развившихся ~200-400 мм³ опухолей у мышей NSG
CD3хCD20 биспецифическим антителом



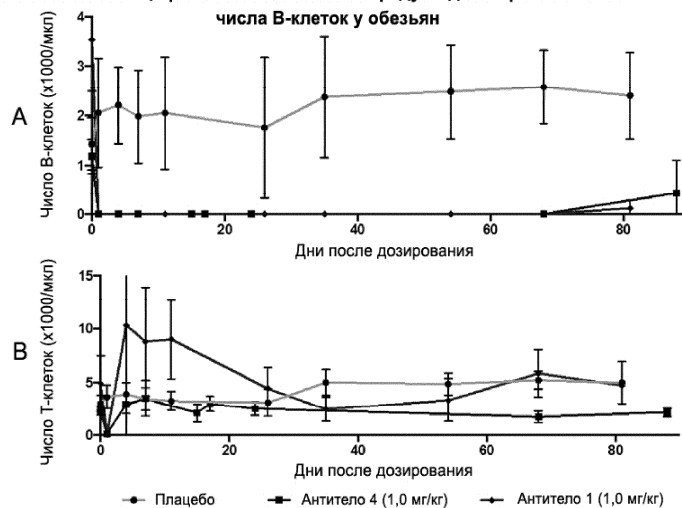
Обработка развившихся ~500-900 мм³ опухолей у мышей NSG
CD3хCD20 биспецифическим антителом



CD20 моноспецифические и CD3хCD20 биспецифические антитела демонстрируют
снижение числа В-клеток в периферической крови

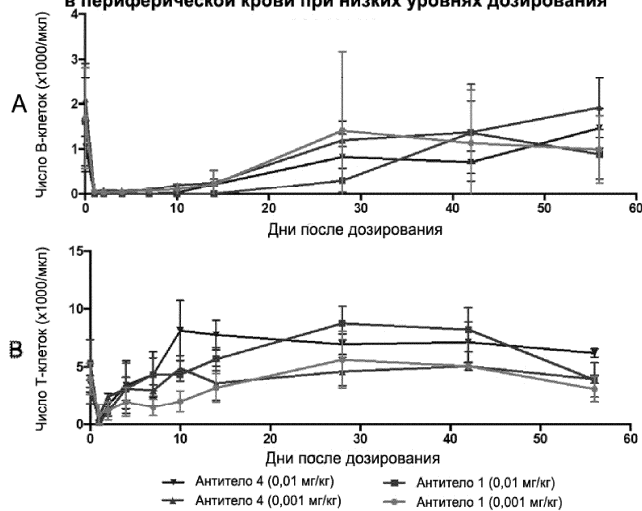


CD3хCD20 биспецифические антитела опосредуют долгосрочное снижение числа В-клеток у обезьян



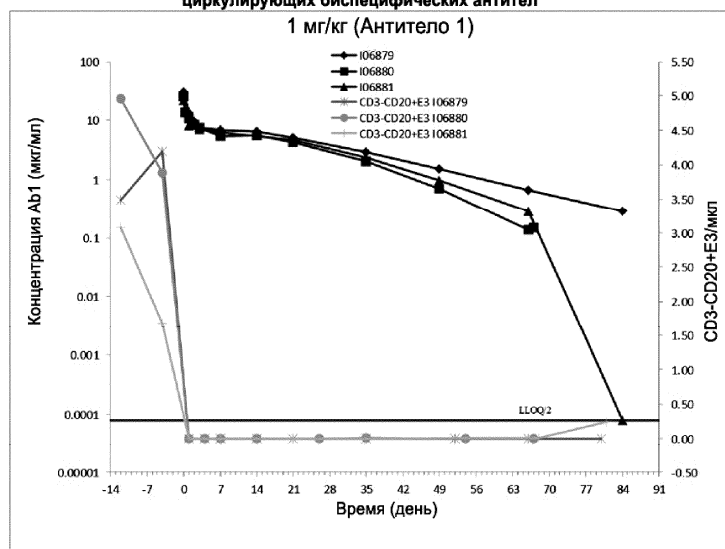
Фиг. 12

CD3хCD20 биспецифические антитела демонстрируют снижение числа В-клеток в периферической крови при низких уровнях дозирования



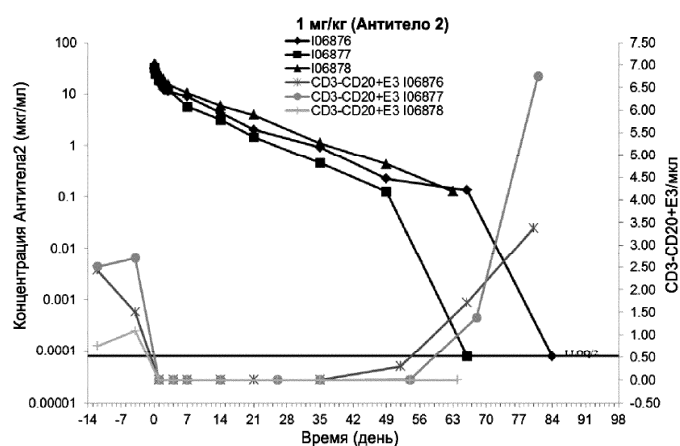
Фиг. 13

Восстановление числа В-клеток коррелирует с исчезновением выявляемых уровней циркулирующих биспецифических антител



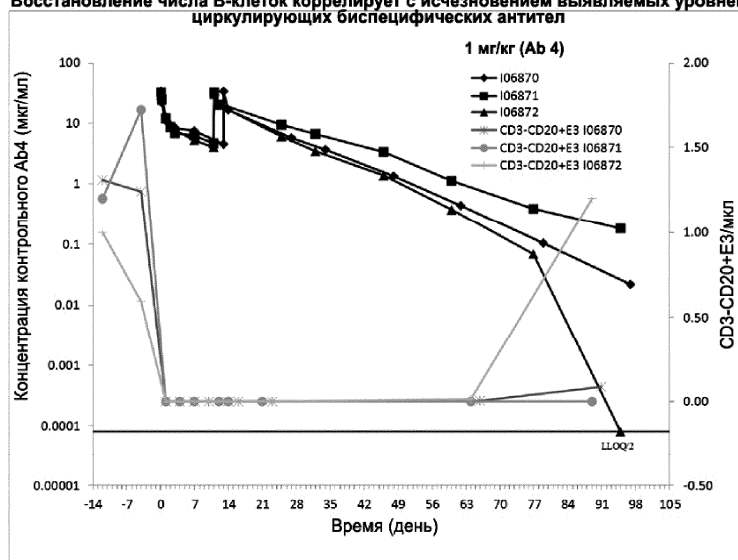
Фиг. 14

Восстановление числа В-клеток коррелирует с исчезновением выявляемых уровней циркулирующих биспецифических антител



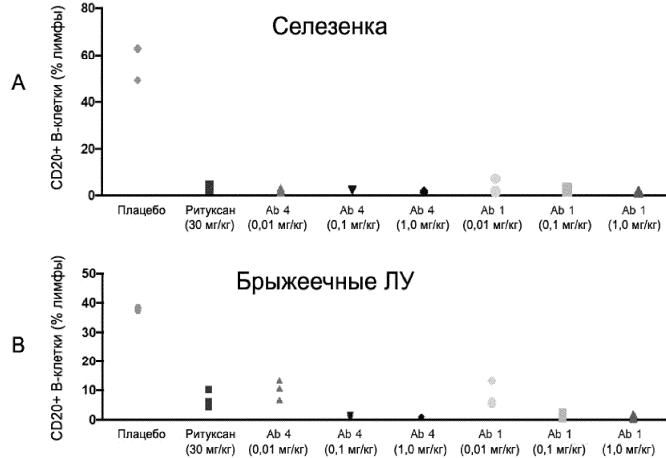
Фиг. 15

Восстановление числа В-клеток коррелирует с исчезновением выявляемых уровней циркулирующих биспецифических антител



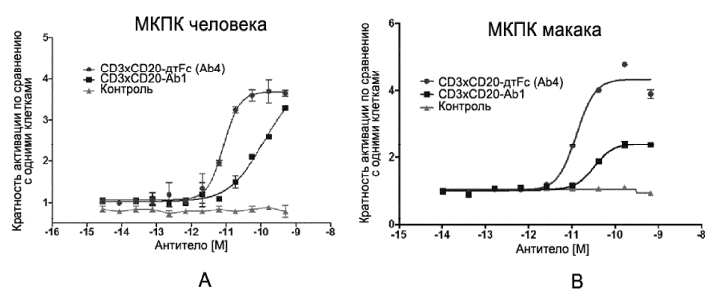
Фиг. 16

CD3хCD20 биспецифические антитела демонстрируют способность снижать число В-клеток в лимфоидных органах



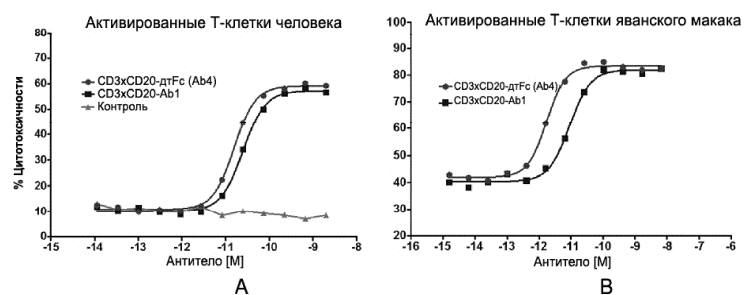
Фиг. 17

CD3xCD20 биспецифические антитела индуцируют пролиферацию Т-клеток *in vitro*

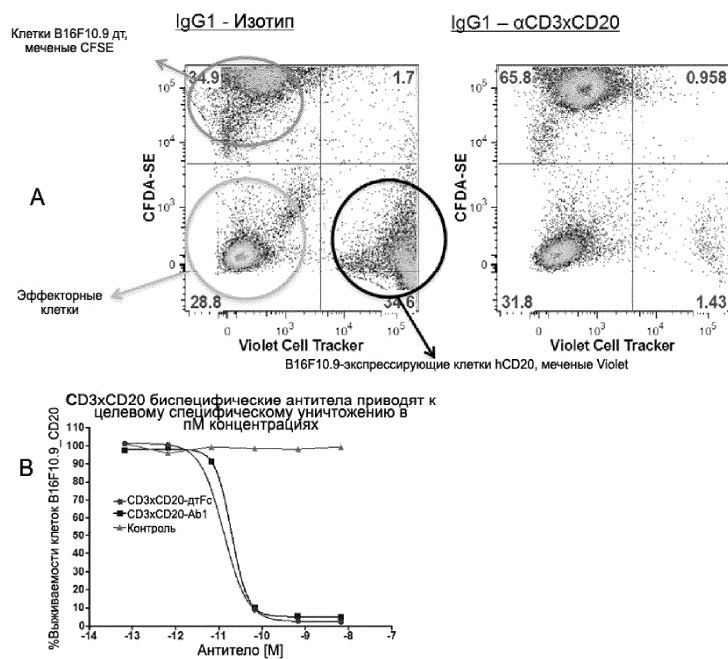


Фиг. 18

CD3xCD20 биспецифические антитела опосредуют уничтожение клеток активированными Т-клетками в *in vitro* биоанализе

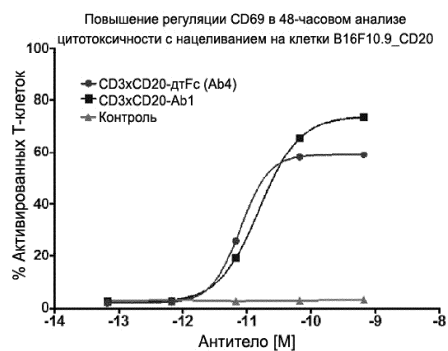


Фиг. 19А,В



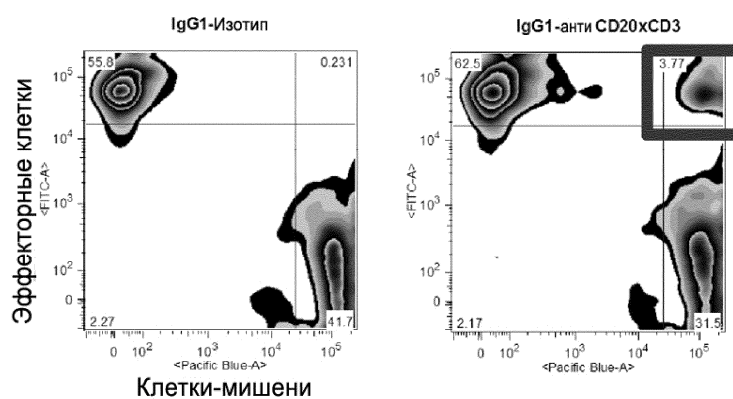
Фиг. 20А,В

Маркеры активации Т-клеток индуцируются обработкой биспецифическим Ab



Фиг. 21

CD3xCD20 биспецифические антитела индуцируют кластеризацию Т-клеток с клетками-мишенями



А

В

Фиг. 22A,B

Лечение мышей NSG с развившимися опухолями Raji



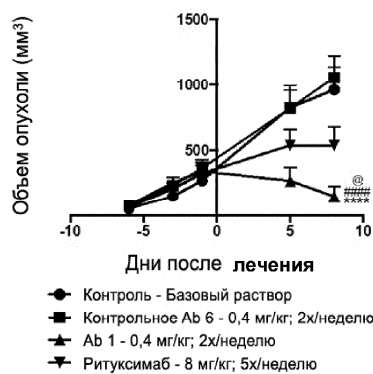
**** - по сравнению с контрольным базовым раствором; ##### - по сравнению с контрольным Ab6;

@ - по сравнению с ритуксимабом; ns - не существенно

Данные представляют обобщенные данные для n=4-6 мышей на группу. Данные выражены как среднее (СПС) и были проанализированы с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорных критериев для изучения существенных эффектов (двухфакторный ANOVA Тьюки). Две мыши из группы CD19 BiTE и одна мышь из группы Ab1 были исключены из этого обобщенного графика вследствие ранней смерти с целью провести анализ данных с помощью двухфакторного ANOVA.

Фиг. 23

Лечение мышей NSG с развившимися опухолями Raji



**** - по сравнению с контрольным базовым раствором; #### - по сравнению с контрольным Ab6;

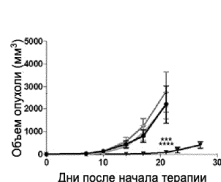
@ - по сравнению с ритуксимабом

Данные представляют обобщенные данные для n=4-6 мышей на группу. Данные выражены как среднее (СПС) и были проанализированы с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорных критериев для изучения существенных эффектов (двухфакторный ANOVA Тьюки).

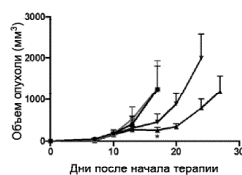
Одна мышь из группы Ab1 была исключена из этого обобщенного графика вследствие ранней смерти с целью провести анализ данных с помощью двухфакторного ANOVA.

Фиг. 24

Лечение мышей hCD3 с имплантированными опухолями CD20/B16F.9



**** - по сравнению с базовым раствором; *** - по сравнению с контрольным Ab6
Данные представляют обобщенные данные для n=5 мышей на группу.
Данные выражены как среднее (СПС) и были проанализированы с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорных критериев для изучения существенных эффектов (двухфакторный ANOVA Тьюки).



* - по сравнению с базовым раствором и контрольным антителом
Данные представляют обобщенные данные для n=5 мышей на группу.
Данные выражены как среднее (СПС) и были проанализированы с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

A

Фиг. 25A,B

B



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2