

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202193205 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.04.19(22) Дата подачи заявки  
2020.05.29(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 39/44* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

## (54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

(31) 62/855,040; 62/944,698

(32) 2019.05.31; 2019.12.06

(33) US

(86) PCT/IB2020/055128

(87) WO 2020/240502 2020.12.03

(88) 2021.07.15

(71) Заявитель:  
МЕДИММЬОН, ЭЛЭЛСИ; ДАНА-  
ФАРБЕР КЭНСЕР ИНСТИТЬЮТ,  
ИНК (US)

(72) Изобретатель:

Киннир Криста, Тайс Девид Алан,  
Коутс Стивен, Тай Ю-Тзу, Андерсон  
Кеннет (US)

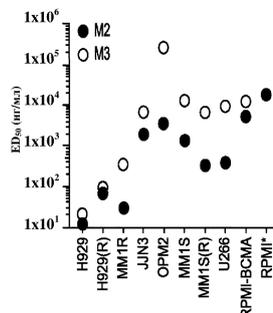
(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к способам и композициям для лечения В-клеточного злокачественного новообразования. В частности, настоящее изобретение относится к лекарственному препарату или композиции для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, содержащим (а) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и (b) ингибитор протеасомы.

Экспрессия BCMA

5-мерный анализ с СССС	H929	H929(R)	MM1R	JUN3	OPM2	MM1S	MM1S(R)	U266	RPMI-BCMA	RPMI*	
ED <sub>50</sub> (нг/мл)	M2	11,85	68,95	29,83	1833	3499	1362	333,5	412	5410	19311
	M3	21,28	104,8	341,3	6823	3E+05	13232	6632	9969	12323	н.д.
Соотношение ED <sub>50</sub>	M2/M3	0,56	0,66	0,09	0,27	0,01	0,10	0,05	0,04	0,44	н.д.

\*нечувствительный к M3  
н.д., недоступно

202193205 A1

202193205 A1

## КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ  
Содержание перечня последовательностей, поданного в электронном виде в текстовом файле в формате ASCII (название: BCMA-150-US-PSP-SequenceListing.txt; размер: 11279 байт, и дата создания: 28 мая 2019 г.), поданного с заявкой, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак крови является термином, который используется для описания многих различных типов рака, которые поражают клетки крови, костный мозг или лимфатическую систему. Согласно опубликованным данным, в США каждый год виды рака крови составляют почти 10% новых случаев рака, причем только в США более чем 1,2 миллиона человек живут с раком крови или пребывают в ремиссии. Он является пятым по распространенности видом рака в Соединенном Королевстве: более чем 240000 человек живут с раком крови в Соединенном Королевстве, и у 40000 человек каждый год диагностируется рак крови. Три основные группы включают лейкоз, лимфому и миелому, каждая из которых представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

Например, В-клеточная злокачественная миелома (например множественная миелома (ММ)) представляет собой злокачественное новообразование из клональных плазматических клеток (например В-клеток) с продолжительным повреждением ДНК, ассоциированным с прогрессированием от предзлокачественной моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS) до активной ММ. Современные схемы лечения миеломы включают традиционные кортикостероиды, алкилирующие средства, ингибиторы протеасом (PI) и иммуномодулирующие лекарственные средства (IMiD), которые помогают повысить общий показатель выживаемости пациентов с миеломой. Особенно интересным терапевтическим направлением, которое было исследовано в последние годы, является иммунотерапия (например с помощью моноклональных антител). Например, в WO 2010/104949 и WO 2019/025983 описаны антитела, которые связываются с антигеном, известным как антиген созревания В-клеток (BCMA), который, как было показано, обладает хорошей селективностью в отношении В-клеточных злокачественных новообразований (в частности клеток миеломы), при этом описанные антитела проявляют активность против В-клеточных злокачественных новообразований.

Несмотря на возросшую доступность различных способов лечения, в основе рецидива заболевания (особенно при миеломе) лежит развитие устойчивости к лекарственному средству, и эффективность любого лечения ограничена максимальной эффективностью, которую можно достичь посредством переносимой дозы.

Следовательно, существует потребность в улучшенном лекарственном препарате, обладающем активностью против В-клеточных злокачественных новообразований. Настоящее изобретение позволяет решить одну или несколько из вышеупомянутых проблем.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии В-клеточного злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение основано на открытии того факта, что ингибитор протеасомы (например бортезомиб) можно использовать для синергического действия с конъюгатом антитело к ВСМА-лекарственное средство (и наоборот), повышая цитотоксичность клеток в отношении В-клеточного злокачественного новообразования после контакта с комбинацией данных средств. Таким образом, важным открытием настоящего изобретения является то, что ингибитор протеасомы можно применять для усиления активности конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении В-клеточных злокачественных новообразований (и наоборот), более конкретно, если лекарственное средство (или указанный конъюгат антитело-лекарственное средство) представляет собой средство, сшивающее нуклеиновые кислоты.

В одном аспекте в данном документе предусмотрен лекарственный препарат для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, содержащий:

- a. конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном созревания В-клеток (ВСМА), конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
- b. ингибитор протеасомы;

где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ADC.

В другом аспекте в данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, при этом указанная терапевтическая комбинация содержит:

- a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и

b. ингибитор протеасомы;

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.

В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования, при этом способ включает введение субъекту терапевтической комбинации, содержащей:

a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и

b. ингибитор протеасомы;

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.

В другом аспекте в данном документе предусмотрен *in vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ADC, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (a) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, в комбинации с (b) ингибитором протеасомы.

В другом аспекте в данном документе предусмотрен *in vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ингибитора протеасомы, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (a) ингибитором протеасомы в комбинации с (b) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показано, что M2 более цитотоксичен в отношении клеток MM, чем его гомолог ADC на основе MMAF (M3). А Последовательные разбавления M2 или M3 добавляли к культурам клеток MM на 3 дня с последующим анализом жизнеспособности клеток ССК8. Показаны значения ED<sub>50</sub>

для М2 (черный круг) и М3 (незакрашенный круг), определенные в одном репрезентативном эксперименте в трех повторениях с тремя повторностями для каждой дозы. Клетки MM1S(R) и H929(R), полученные из MM1S и H929 соответственно, устойчивы к леналидомиду и помалидомиду. RPMI-BCMA – клетки RPMI8226, сверхэкспрессирующие BCMA; RPMI – клетки RPMI8226. В М2 (черный круг) или М3 (белый круг) добавляли на 3 дня с последующим анализом пролиферации клеток с применением включения  $[H^3]$  тимидина (слева) и анализом жизнеспособности на основе ССК8 для RPMI8226 и люминесцентным определением скорости роста клеток по их титру (СТГ) для парных клеток ANBL6 и ANBL6-BR (устойчивых к бортезомибу (btz)). С Пары клеток MM, устойчивых к дексаметазону (Dex) и btz, обрабатывали с помощью М2 или М3 в течение 2 дней с последующим анализом посредством проточной цитометрии (FCM) с определением процента апоптотических клеток (аннексин V+/Aqua- и аннексин V+/Aqua+). \*\*\*,  $p < 0,0005$ ; \*\*,  $p < 0,005$ .

На **ФИГ. 2** показано, что М2 более эффективно, чем М3, блокирует BMSC-индуцированную жизнеспособность клеток MM и является цитотоксичным в отношении первичных клеток MM, полученных от пациента. А Клетки MM1Sluc, отдельно или с BMSC, обрабатывали с помощью М2 или М3 в течение 4 дней и посредством BLI определяли жизнеспособность клеток. В CFSE-меченные устойчивые к IMiD клетки MM1S(R) или H929(R) инкубировали с указанными лекарственными средствами в присутствии или в отсутствие BMSC в течение 2 дней с последующим FCM-анализом с применением аннексина V и окрашивания с помощью красителя Live/dead Aqua. Показаны процентные уровни Аннексин V-/Aqua- (жизнеспособных) CFSE+ клеток MM в одном из трех экспериментов с тремя повторностями для каждой дозы. С Клетки H929, отдельно или с IL-6 (5 нг/мл), обрабатывали с помощью М2 в течение 2 дней и измеряли процентные уровни аннексин V-/Aqua- (жизнеспособных) клеток. D CD138+ клетки от репрезентативного пациента с RRMM инкубировали с М2 или М3 в течение 3 дней и измеряли доли живых/мертвых клеток. E CD138+ клетки от пациентов с RRMM ( $n = 3$ ) инкубировали с М2 в течение 3 дней с последующим СТГ-анализом. F BMSC от пациентов с MM (NDMM = 4, RRMM = 2) обрабатывали с помощью М2 (10 мкг/мл) в течение 5 дней. Процентные уровни жизнеспособных CD38highCD138+ клеток определяли посредством FCM-анализа.

На **ФИГ. 3** показано, что М2 более эффективно, чем М3, блокирует пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз в линиях клеток MM независимо от чувствительности к лекарственному средству. А М1 (конъюгат PBD с изотипическим антителом), М2 (конъюгат PBD с антителом к BCMA), М3 (гомолог конъюгата MMAF с антителом к BCMA) и М4 (конъюгат MMAF с изотипическим антителом) добавляли к клеткам MM в трех повторностях на 3 дня с последующим анализом жизнеспособности ССК8. В М2 или М3 добавляли на 3 дня с последующим анализом пролиферации с применением включения  $[H^3]$ -тимидина. С На клетках ANBL6 (чувствительные к btz) и ANBL6-BR (устойчивые к btz) подтверждали результаты после обработки с помощью btz в течение 2 дней с применением анализа выживаемости на основе СТГ (слева) и анализа апоптоза на основе FCM с применением аннексина V и окрашивания красителем Live/dead Aqua (справа). D

Клетки MM1S (верхняя панель) и MM1R (нижняя панель) обрабатывали указанными лекарственными средствами. Показаны процентные уровни аннексин V+ клеток MM.

На **ФИГ. 4** показано, что M2 индуцирует специфическую цитотоксичность в отношении клеток MM, защищенных с помощью BMSC и IL-6, и дополнительно истощает CD38highCD138+ клетки MM пациента. **A** Различные чувствительные и устойчивые к лекарственному средству линии клеток MM (n = 6) отдельно или с BMSC обрабатывали с помощью M2 в течение 3 дней с последующим CTG-анализом. **B** ВСМА-отрицательные клетки BMSC, PBMC и NK обрабатывали с помощью M2 в течение 5 дней. **C** Клетки H929, отдельно или с IL-6 (5 нг/мл), обрабатывали с помощью M2 в течение 3 дней. **D** ВММС от репрезентативного пациента с NDMM инкубировали с M2 в течение 5 дней. M2 дозозависимым образом снижал количество CD38highCD138+ клеток MM.

На **ФИГ. 5** показано, что M2 вместе с бортезомибом синергически индуцирует гибель клеток MM. **A-B** Клетки MM обрабатывали указанными лекарственными средствами в течение 2 дней с последующим FCM-анализом с применением окрашивания с помощью PI и аннексина V. Показаны результаты для одного репрезентативного образца каждой линии клеток (**A**) и сводные данные по процентным уровням аннексин V+ клеток в трех повторениях (**B**). \*, p < 0,01; \*\*, p < 0,005, \*\*\*, p < 0,002, **C** Для определения показателя аддитивности (CI) использовали данные из анализов жизнеспособности клеток на основе CTG. "Эффект" означает степень снижения жизнеспособности клеток под действием M2 и btz. CI < 1 указывает на синергизм обоих лекарственных средств. Сходные результаты были получены для дополнительных 3 повторений.

На **ФИГ. 6** показано, что комбинация низких доз M2 и btz запускает синергическую гибель клеток MM. Указанные линии клеток MM инкубировали с M2 и btz в течение 3 дней, по отдельности или вместе, с последующим анализом жизнеспособности на основе CTG. "Эффект" представляет собой долю клеток, демонстрирующих снижение жизнеспособности при обработке комбинацией M2 плюс btz. Показатель аддитивности (CI) < 1 указывает на синергию. Все эксперименты проводили в трех повторностях и показано среднее значение.

На **ФИГ. 7** показано, что M2 в комбинации с бортезомибом индуцирует более эффективную активность в отношении MM *in vivo* и продлевает выживаемость мышей по сравнению с лекарственным средством отдельно. **A** Мышей SCID CB17 (n = 7 в каждой группе) с пальпируемыми имплантатами опухолей MM1S рандомизировали и обрабатывали контрольной средой-носителем, однократной дозой M2 (0,4 мг/кг), шестью дозами btz (0,4 мг/кг) или комбинацией M2 и btz (M2+btz) в течение 2 недель. Рост опухоли значимо подавлялся в группе, обработанной комбинацией, по сравнению с контрольными группами (cnt). (M2 относительно M2 + btz, p = 0,035; btz относительно M2 + btz, p < 0,005; cnt относительно M2 + btz, p = 0,0012; btz относительно cnt, p < 0,005; M2 относительно cnt, p < 0,005). \*, p < 0,04, \*\*, p < 0,005, **B** Отслеживали значения веса тела животных. **C** С применением анализа Каплана-Мейера и лог-рангового анализа значимо продлевалась медианная общая выживаемость животных, обработанных средством комбинированной терапии. (cnt, 22 дня; M2, 40,5 дня; btz, 35 дней; M2 + btz, 57 дней) (M2 относительно M2 + btz, p < 0,045; btz относительно M2 + btz, p < 0,023; cnt относительно M2 + btz,

$p < 0,002$ ). **D** Срезы опухолевой ткани из каждой группы анализировали посредством иммуногистохимического анализа в отношении Ki-67 (исходное увеличение  $\times 400$ ).

На **ФИГ. 8** показано, что способы комбинированной обработки с помощью M2 и btz значительно снижали скорость роста ксенотрансплантатов MM1S *in vivo*, демонстрируя синергизм *in vivo* M2 и btz в лечении миеломы. У репрезентативных мышей опухоли удаляли в тот же день обработки.

На **ФИГ. 9** показано, что M2 значительно индуцирует фосфорилирование в сигнальных путях ответа на повреждение ДНК (DDR) в клетках MM, независимо от статуса p53 и устойчивости к лекарственному средству. Клетки MM с p53 дикого типа (MM1S, MM1R, H929) и мутантным p53 (\*) обрабатывали указанными дозами M2 (a-d) в течение указанных периодов времени (a) в течение ночи (b, d) или в течение 2 дней (c). Лизаты клеток получали и анализировали посредством иммуноблоттинга с применением специфических антител к указанным молекулам. cPARP – расщепленная форма PARP; cCas3 – расщепленная каспаза 3. Эксперименты повторяли три раза.

На **ФИГ. 10** показано, что M2 значительно индуцирует сигнальные каскады DDR с последующим BCMA-зависимым апоптозом. Указанные клетки MM обрабатывали указанными дозами M2 (A-B, D-F) или M3 (A, F, G) в течение ночи (A, D, G) или 2 дней (B, E-F). Лизаты клеток получали и анализировали посредством иммуноблоттинга с применением специфических антител к указанным молекулам. M2, но не M3, индуцирует сигнальные пути DDR. cPARP – расщепленная форма PARP; cCas3 – расщепленная каспаза 3. (C) Уровни BCMA измеряли с применением qRT-PCR. BCMA<sup>medium</sup>, BCMA<sup>low</sup> и BCMA<sup>high</sup> были получены из исходной линии RPMI8226.

**ФИГ. 11** Обработка с помощью M2 индуцирует экспрессию генов, связанных с DDR, в том числе RAD51. РНК из жизнеспособных клеток MM H929, обработанных с помощью M2 в сублетальных условиях, анализировали с применением микрочипа TagMan® для исследования путей репарации ДНК человека (a). Транскрипты подвергали нормализации по геометрическим средним значениям внутренних контролей и показаны кратные изменения в группах, обработанных с помощью M2, по сравнению с контрольными (cnt) группами. Для определения уровней белка RAD51 (b-c) получали лизаты клеток из различных линий клеток MM, обработанных с помощью M2, для иммуноблоттинга.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в данном документе предусмотрен лекарственный препарат для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, содержащий:

- a. конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
- b. ингибитор протеасомы;

где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ADC.

В другом аспекте предусмотрена терапевтическая комбинация для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, при этом указанная терапевтическая комбинация содержит:

- a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
- b. ингибитор протеасомы;

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.

В связанном аспекте в данном документе предусмотрен способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования, при этом способ включает введение субъекту терапевтической комбинации, содержащей:

- a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
- b. ингибитор протеасомы;

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.

Указанная повышенная супрессия В-клеточного злокачественного новообразования может предусматривать одно или несколько проявлений супрессии, выбранных из повышенного замедления роста опухоли, повышенного уменьшения размера опухоли, повышенного снижения метастазирования опухоли, повышенного показателя выживаемости субъекта, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, или их комбинации.

Термин "В-клеточное злокачественное новообразование" охватывает любое заболевание, при котором В-клетки становятся раковыми и бесконтрольно делятся (например, в костном мозге и

крови) и могут проникать в другие участки (например ткани и лимфатические системы). В одном варианте осуществления указанное В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой одно или несколько новообразований, выбранных из В-клеточной лимфомы, В-клеточного лейкоза, миеломы (например множественной миеломы и или клеток-предшественников миеломы) или их комбинации. Термин "В-клетка" охватывает как зрелые (дифференцированные) В-клетки, так и их предшественники (например стволовые клетки). Например, охватываются стволовые клетки миеломы и клетки-предшественники миеломы.

В одном варианте осуществления В-клеточное злокачественное новообразование характеризуется наличием злокачественных В-клеток, которые экспрессируют ВСМА. В одном варианте осуществления указанная злокачественная В-клетка экспрессирует высокий уровень антигена ВСМА (по сравнению с эталонной незлокачественной В-клеткой). Считается, что злокачественная В-клетка экспрессирует "высокий уровень ВСМА", если уровень экспрессии антигена ВСМА в злокачественной В-клетке повышается до статистически значимого уровня по сравнению с уровнем экспрессии ВСМА в незлокачественной (например здоровой) В-клетке.

Примеры В-клеточной лимфомы включают диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), мантийноклеточную лимфому (MCL), различные виды лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС) и первичную внутриглазную лимфому. Примеры В-клеточного лейкоза включают В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток и волосатоклеточный лейкоз.

В одном варианте осуществления указанное В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой миелому (например множественную миелому).

Множественная миелома (ММ), также известная как плазмноклеточная миелома или болезнь Калера, представляет собой рак из В-клеток (плазматических клеток), которые представляют собой тип белых клеток крови, обычно ответственных за выработку антител. Современные способы терапии ММ включают химиотерапию, облучение, хирургическое вмешательство, биофосфонаты и трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT). Хотя такие способы терапии часто вызывают ремиссии, практически у всех пациентов в конечном итоге случается рецидив и они умирают. Множественная миелома поражает 1-4 человека на 100000 человек в год. Заболевание более распространено у мужчин и по неизвестным причинам в два раза чаще встречается у афроамериканцев, чем у европеоидных американцев.

Антиген созревания В-клеток (BCMA), также известный как представитель 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), является представителем семейства рецепторов некроза опухоли (TNFR), экспрессируемым на клетках В-клеточной линии дифференцировки. Экспрессия BCMA наиболее высокая на терминально дифференцированных В-клетках. BCMA участвует в опосредовании выживания плазматических клеток для поддержания долговременного гуморального иммунитета. Экспрессия BCMA была связана с рядом видов рака, аутоиммунных нарушений и инфекционных заболеваний. РНК BCMA была выявлена повсеместно в клетках множественной миеломы, и несколькими исследователями на поверхности плазматических клеток у пациентов с множественной миеломой был выявлен белок BCMA. Таким образом, BCMA представляет собой терапевтическую мишень в случае В-клеточных злокачественных новообразований, особенно множественной миеломы.

Нуклеотидная последовательность BCMA человека (TNFRSF17) описана в Ensembl (см. номер доступа ENSG00000048462), которая включена в данный документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность BCMA (TNFRSF17) описана в UniProt (см. номер доступа Q02223, который включен в данный документ посредством ссылки). Аминокислотная последовательность BCMA человека представлена под SEQ ID NO: 13.

BCMA также экспрессируется на стволовых клетках множественной миеломы. Таким образом, термин "миелома" охватывает "стволовые" клетки множественной миеломы и "клетки-предшественники" миеломы. Кроме того, способы и пути применения по настоящему изобретению охватывают лечение злокачественных новообразований, содержащих стволовые клетки множественной миеломы (например, которые экспрессируют BCMA). Стволовые клетки множественной миеломы (и/или клетки-предшественники миеломы) можно идентифицировать в костном мозге пациентов с множественной миеломой по их поверхностной экспрессии CD19 и отсутствию поверхностной экспрессии CD138. Эти клетки являются исключительно клоногенными и хорошо имплантируются мышам с иммунодефицитом, при этом плазматические клетки миеломы, определенные как CD138+CD19-, не обладают такими свойствами.

Термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" означает антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), присоединенное к цитотоксическому средству (обычно низкомолекулярному лекарственному средству с высокой системной токсичностью) посредством химических линкеров. Данный термин используется в данном документе для описания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые конъюгированы со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления ADC может содержать средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (например низкомолекулярный цитотоксин), которое было химически модифицировано таким образом, что содержит линкер. Линкер затем можно использовать для конъюгации средства, сшивающего нуклеиновые кислоты (цитотоксина), с

антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом. После связывания с антигеном-мишенью на поверхности клетки (например ВСМА) ADC интернализуется и переносится в лизосому, где средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (цитотоксин), высвобождается в результате либо протеолиза расщепляемого линкера (например, с помощью катепсина В, находящегося в лизосоме), либо в результате протеолитической деградации антитела, например, если оно присоединено к цитотоксину посредством нерасщепляемого линкера. Цитотоксин затем транслоцируется из лизосомы в цитозоль или ядро, где он затем может связываться со своей мишенью в зависимости от его механизма действия.

В одном варианте осуществления указанное средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой цитотоксическое средство, сшивающее нуклеиновые кислоты.

Ингибиторы протеасом нашли свое применение в ряде средств терапии рака. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что ингибитор протеасом можно применять для усиления (например синергического усиления) активности ADC по настоящему изобретению в отношении В-клеточного злокачественного новообразования, и наоборот, ADC по настоящему изобретению можно применять для усиления (например синергического усиления) активности ингибитора протеасомы в отношении В-клеточного злокачественного новообразования. Без ограничения теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что активность ингибитора протеасомы может усиливать активность ADC по настоящему изобретению, вызывая последующий (молекулярный) эффект, приводящий к супрессии молекулы(молекул), например, которая в норме может ингибировать активность входящего в состав ADC средства, сшивающего нуклеиновые кислоты (например цитотоксина PBD), и это может даже приводить к развитию устойчивости к средству, сшивающему нуклеиновые кислоты. Такая активность может быть связана с его "нормальной" активностью в качестве прямого ингибитора протеасомы или может быть не связана с ней. Данная теория подтверждается наблюдением того, что терапевтическая комбинация по настоящему изобретению проявляет повышенную активность даже в отношении злокачественных В-клеток, которые устойчивы к ингибитору протеасомы (например бортезомибу) в качестве монотерапии.

И наоборот, без ограничения теорией, активность ADC по настоящему изобретению может усиливать активность ингибитора протеасомы, вызывая последующий (молекулярный) эффект, приводящий к супрессии молекулы(молекул), например, которая в норме может подавлять активность ингибитора протеасомы, и это может даже приводить к развитию устойчивости к ингибитору протеасомы.

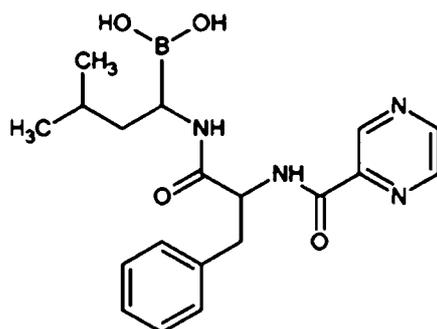
Ингибиторы протеасом вызывают несколько последствий. Например, они могут вызывать повышение уровней биологически активных белков, таких как IκB, который является ингибитором ядерного фактора-каппаВ (белка, участвующего в выживании клеток). Кроме того, неправильно

свернутые и другие нефункциональные белки также накапливаются и запускают ответ на присутствие несвернутых белков (UPR), который влечет за собой стресс эндоплазматического ретикулума (ER).

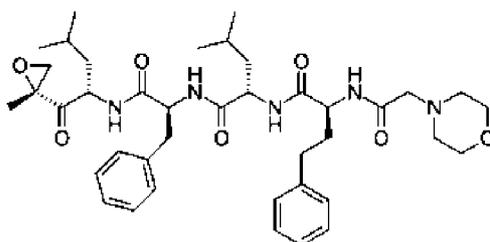
В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы представляет собой ингибитор протеасомы на основе бороновой кислоты (например бортезомиб).

В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы представляет собой один или несколько ингибиторов, выбранных из бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, маризомиба, опрозомиба, деланзомиба или их комбинации. В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы представляет собой бортезомиб.

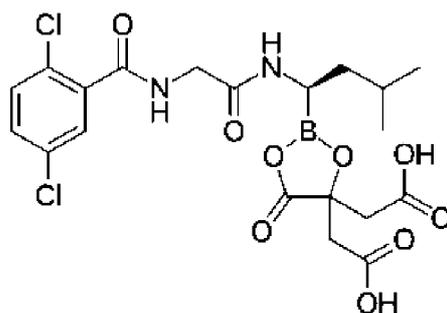
Бортезомиб (например велкейд), ранее известный как PS-341 (Millennium Pharmaceuticals, Кембридж, Массачусетс, США), действует как ингибитор 26S-протеасомы, полисубъединичного белкового комплекса, который отвечает за деградацию убиквитинированных белков. Бортезомиб представляет собой боронат пептида с молекулярной формулой  $C_{19}H_{25}BN_4O$ :



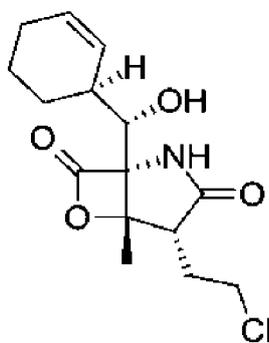
Карфилзомиб (Kyprolis®) представляет собой ингибитор протеасомы на основе эпоксикетона, необратимо связывающийся с субъединицей  $\beta$  5 (PSMB5). Его формула представляет собой:



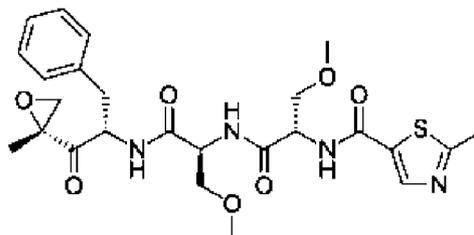
Иксазомиб (Ninlaro®) селективно и обратимо подавляет белок субъединицы протеасомы бета типа-5 (PSMB5). Его формула представляет собой:



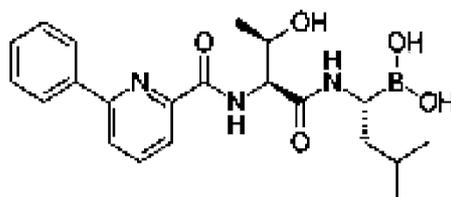
Маризомиб (салиноспорамид А) ингибирует активность протеасомы посредством ковалентной модификации остатков треонина в активном центре 20S-протеасомы. Он необратимо связывается с 3 основными каталитическими центрами на белковых субъединицах протеасомы  $\beta 5$ ,  $\beta 1$  и  $\beta 2$ . Его формула представляет собой:



Опрозомиб (известный как ONX 0912) характеризуется следующей формулой:



Деланзомиб (известный как SEP-18 770) характеризуется следующей формулой:



В одном варианте осуществления лекарственный препарат и/или терапевтическая композиция содержатся в фармацевтической композиции. Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической

активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Такая композиция может быть стерильной. Лекарственный препарат и/или терапевтическая композиция могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. Примером носителя является физиологический солевой раствор. Подходящие фармацевтические композиции могут содержать одно или несколько из буфера (например, ацетатного, фосфатного или цитратного буфера), поверхностно-активного вещества (например полисорбата), стабилизатора (например альбумина человека), консерванта (например бензилового спирта) и стимулятора всасывания для повышения биодоступности и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих средств.

В одном варианте осуществления лекарственный препарат, терапевтическая комбинация или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый нетоксичный стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, раскрытых в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012). В одном варианте осуществления лекарственный препарат, терапевтическая комбинация или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут содержаться в одном или нескольких составах, выбранных из капсулы, таблетки, водной суспензии, раствора, назального аэрозоля или их комбинации. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например полисорбат), необязательно стабилизирующее средство (например альбумин человека) и т. п.

Средство, которое является "цитотоксическим" (называемое в данном документе как "цитотоксин" или "цитотоксическое средство"), представляет собой средство, которое подавляет или предотвращает функционирование клеток, и/или вызывает разрушение клеток (гибель клеток), и/или оказывает антипролиферативные эффекты. Будет понятно, что цитотоксин или цитотоксическое средство в составе ADC в данной области техники также называется "полезной нагрузкой" в составе ADC.

Термин "средство, сшивающее нуклеиновые кислоты" означает молекулу, которая реагирует с двумя нуклеотидами нуклеиновой кислоты, образуя между ними ковалентную связь. Такое сшивание может происходить внутри одной и той же цепи (внутрицепочечное) или между противоположными цепями двухцепочечной ДНК (межцепочечное). Эти связи (аддукты) мешают клеточному метаболизму, такому как репликация ДНК и транскрипция, обычно запуская гибель клеток. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

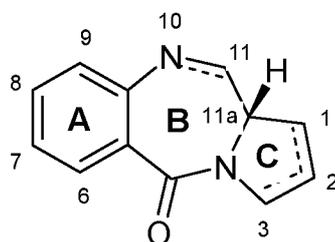
В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой средство, которое повреждает ДНК посредством индукции разрыва цепи ДНК (одноцепочечного разрыва и/или двухцепочечного разрыва) и обычно впоследствии приводит к апоптозу. В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой цитотоксическое средство, сшивающее нуклеиновые кислоты.

В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой одно или несколько средств, выбранных из пирролобензодиазепина (PBD), азотистого иприта, цисплатина, хлорэтилнитрозомочевины (CENU), псоралена, антибиотика митомицина С (ММС) или их комбинации. Указанный азотистый иприт может представлять собой одно или несколько веществ, выбранных из циклофосамида, хлорметина (например мехлорэтамину или мустина), урамустина, урацилового иприта, мелфалана, хлорамбуцила, ифосамида, бендамустина или их комбинации. В одном варианте осуществления указанная CENU представляет собой кармустин.

В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой пирролобензодиазепин (PBD).

Термин "пирролобензодиазепин" охватывает как пирролобензодиазепин, так и его функциональное производное.

PBD представляют собой класс цитотоксических средств, которые транслоцируются в ядро перед сшиванием ДНК, предотвращая репликацию в ходе митоза, повреждая ДНК посредством индукции разрыва цепи ДНК (одноцепочечного разрыва и/или двухцепочечного разрыва) и впоследствии приводя к апоптозу. Некоторые PBD также обладают способностью распознавать специфические последовательности ДНК и связываться с ними. В одном варианте осуществления PBD имеет общую структуру:

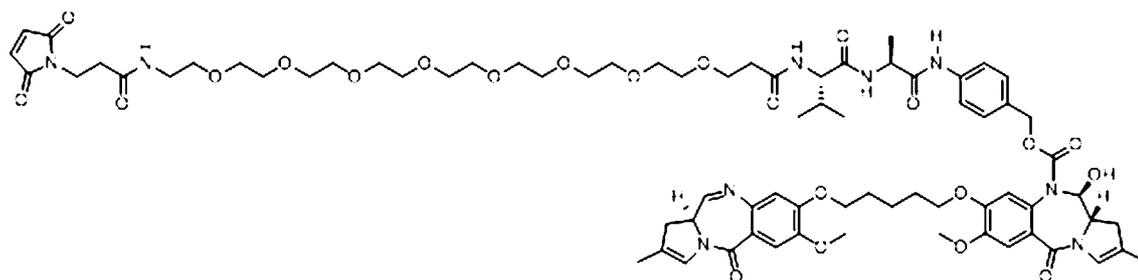


PBD отличаются количеством, типом и положением заместителей как в их ароматических А-кольцах, так и в пиррольных С-кольцах, а также степенью насыщения С-кольца. В В-кольце присутствует либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты характеризуются (S)-конфигурацией в хиральном положении C11a, которая обеспечивает им правовращение, если

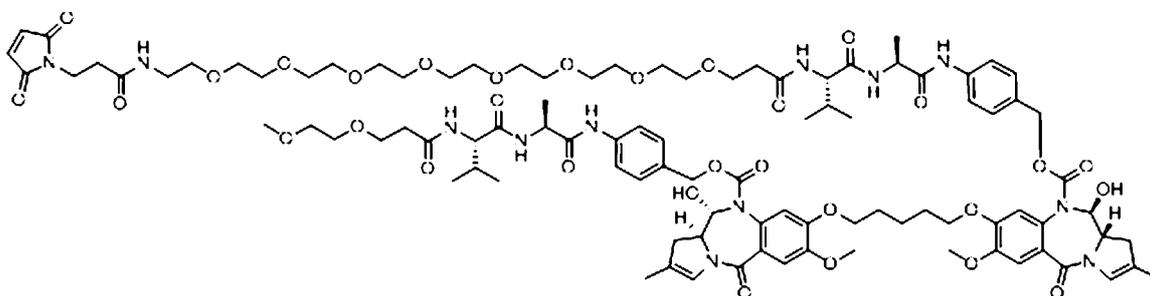
смотреть от С-кольца по направлению к А-кольцу. Данный признак также придает PBD соответствующую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздой В-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания. PBD способны образовывать аддукты в малой борозде, что приводит к вмешательству в процессинг ДНК.

Первый противоопухолевый антибиотик PBD, антрамицин, был открыт в 1965 году. С тех пор сообщалось о ряде встречающихся в природе PBD и было разработано более 10 путей синтеза множества аналогов. К представителям семейства относятся аббеймицин, чикамицин, DC-81, мазетрамицин, неотрамицины А и В, поротрамицин, протракарцин, сибаномицин (DC-102), сибиромидин и томамицин. PBD и содержащие их ADC также описаны в WO 2015/155345 и WO 2015/157592, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

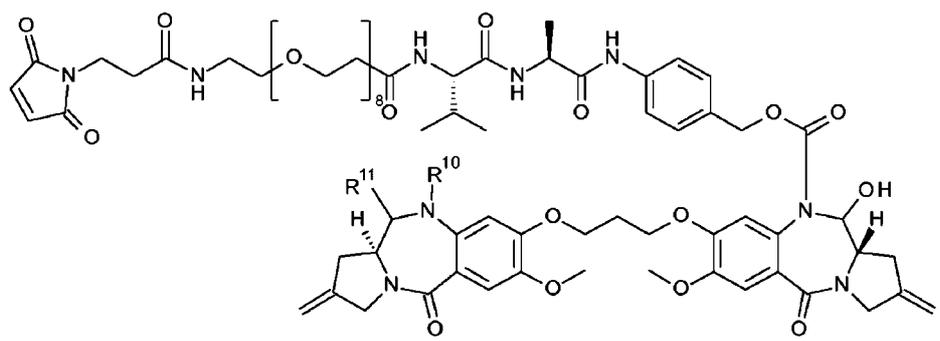
В одном варианте осуществления PBD представляет собой PBD 3249, также называемый в данном документе как "SG3249" (например, описанный более подробно в WO 2014/057074, включенной в данный документ посредством ссылки). PBD 3249 (SG3249) имеет следующую структуру:



В одном варианте осуществления PBD представляет собой PBD 3315, также называемый в данном документе как "SG3315" (например, описанный более подробно в WO 2015/052322, включенной в данный документ посредством ссылки). PBD 3315 (SG3315) имеет следующую структуру:



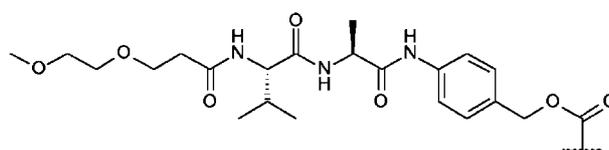
В одном варианте осуществления PBD (например, подробно описанный в WO 2017/137553, включенной в данный документ посредством ссылки) имеет формулу:



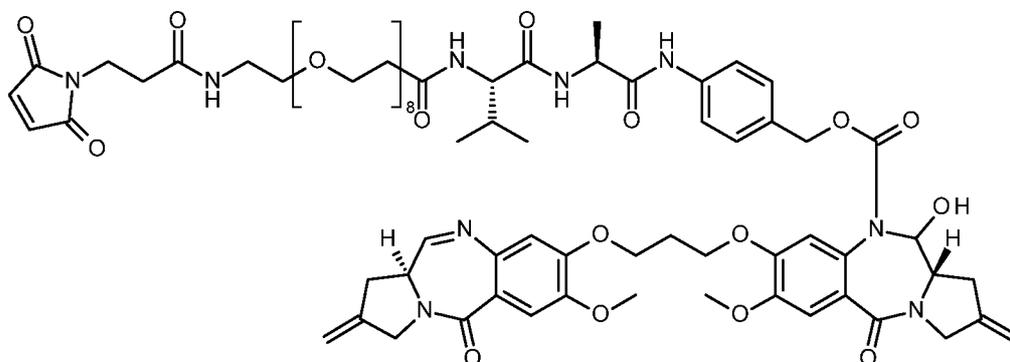
где либо:

(a)  $R^{10}$  и  $R^{11}$  образуют двойную азот-углеродную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо

(b)  $R^{10}$  представляет собой OH, и  $R^{11}$  представляет собой:



В другом варианте осуществления PBD представляет собой SG3400, также называемый соединением 23 (например, подробно описанное в WO 2017/137553, включенной в данный документ посредством ссылки), и характеризуется следующей структурой:



В одном варианте осуществления PBD представляет собой димер PBD, содержащий по меньшей мере два мономера PBD. Например, по меньшей мере два мономера PBD связаны посредством своих фенольных C8-положений ароматического A-кольца посредством гибкого пропилдиоксиэфира.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с цитотоксином (гетерологичным средством), таким как PBD, с применением сайт-специфических способов конъюгации или способов конъюгации, отличных от сайт-специфических.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один,

два, три, четыре или более PBD-фрагментов. В одном варианте осуществления все PBD-фрагменты (конъюгированные с антителом или его фрагментом антигена) имеют одинаковую структуру.

Средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (цитотоксин), по настоящему изобретению может быть связано (например конъюгировано) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством спейсера (например по меньшей мере одного спейсера). В одном варианте осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В одном варианте осуществления спейсер представляет собой непептидный (например химический) спейсер.

Традиционные стратегии конъюгации антител или их антигенсвязывающих фрагментов основаны на случайной конъюгации полезной нагрузки (цитотоксина) с антителом или антигенсвязывающим фрагментом посредством лизинов или цистеинов. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент случайным образом конъюгированы со средством (например цитотоксином), например, посредством частичного восстановления антитела или фрагмента с последующей реакцией с требуемым средством с присоединением линкерного фрагмента или без него. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно восстановить с применением ДТТ или сходного восстановителя. Средство с присоединенным линкерным фрагментом или без него затем можно добавлять с молярным избытком к восстановленному антителу или фрагменту в присутствии DMSO. После конъюгации можно добавлять избыток свободного цистеина для гашения непрореагировавшего средства. Реакционную смесь затем можно очищать и осуществлять замену буфера на PBS.

В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (например цитотоксин), конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством сайт-специфической конъюгации. В одном варианте осуществления сайт-специфическая конъюгация средства, сшивающего нуклеиновые кислоты (например цитотоксина), с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с применением реакционноспособных аминокислотных остатков в определенных положениях приводит к получению гомогенного препарата ADC с однородной стехиометрией.

Сайт-специфическая конъюгация может происходить по остатку цистеина или по неприродной аминокислоте. В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (например цитотоксин), конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством по меньшей мере одного остатка цистеина.

В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (например цитотоксин), химически конъюгировано с боковой цепью аминокислоты (например, в конкретном положении по Kabat в Fc-области антитела или антигенсвязывающего фрагмента). В одном

варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновую кислоту (например цитотоксин), конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством замены цистеина в любом подходящем положении Fc-области на цистеин в по меньшей мере одном из положений 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В одном варианте осуществления конкретными положениями являются 239, 442 или оба, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В одном варианте осуществления конкретными положениями являются положение 442, вставка аминокислоты (цистеина) между положениями 239 и 240 или и то, и другое, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В одном варианте осуществления средство, сшивающее нуклеиновые кислоты (цитотоксин), конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством тиол-малеимидной связи. В некоторых аспектах боковая цепь аминокислоты представляет собой сульфгидрильную боковую цепь, например сульфгидрильную реакционноспособную группу, расположенную на шарнире и тяжелых-легких цепях антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область человеческой каппа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90% или 95% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, и/или
- ii. вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90% или 95% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, и
- ii. вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант.

SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 представляют собой версии VH и VL зародышевого типа. В качестве альтернативы, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать VH и/или VL не зародышевого типа (например, VH под SEQ ID NO: 9 и VL под SEQ ID NO: 10).

Настоящее изобретение охватывает антитела (например антитело или антигенсвязывающий фрагмент), определенные в данном документе, содержащие перечисленные последовательности CDR или последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи (эталонные антитела), а также их функциональные варианты. Функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело (например ВСМА), и может проявлять такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело. Функциональные варианты могут характеризоваться иной аффинностью в отношении антигена-мишени по сравнению с эталонным антителом. В одном варианте осуществления функциональные варианты характеризуются в значительной степени сходной аффинностью.

В одном варианте осуществления функциональные варианты эталонного антитела демонстрируют изменение последовательности в одной или нескольких CDR по сравнению с соответствующими эталонными последовательностями CDR. Так, функциональный вариант антитела может содержать функциональный вариант CDR. Если термин "функциональный вариант" используется в контексте последовательности CDR, то это означает, что данная CDR характеризуется не более чем 2 или не более чем 1 аминокислотным различием(различиями) по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR и в сочетании с оставшимися 5 CDR (или их вариантами) обеспечивает связывание варианта антитела с тем же антигеном-мишенью (например ВСМА), что и эталонное антитело. В одном варианте осуществления функциональный вариант проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

где функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело. В одном варианте осуществления функциональный вариант проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

где функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело. В одном варианте осуществления функциональный вариант проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

Например, функциональный вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать:

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 1;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 2, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 3;

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 4;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 5;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 2 аминокислотными различиями по сравнению с SEQ ID NO: 6;

где вариант антитела связывается с ВСМА (например полипептидным эпитопом ВСМА), и/или где вариант антитела может проявлять такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать:

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 1;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 2, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 3;

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 4;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 5;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с SEQ ID NO: 6;

где вариант антитела связывается с ВСМА (например полипептидным эпитопом ВСМА), и/или где вариант антитела может проявлять такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вышеизложенное может быть применено аналогично к вариантам других антител, описанных в данном документе, где аминокислотные различия определены относительно их последовательностей CDR, и где вариант антитела связывается с тем же антигеном-мишенью, что и указанные антитела, и/или где вариант антитела может проявлять такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие).

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела может характеризоваться в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотными различиями в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 (например, не более 1) аминокислотных различий на CDR. В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела характеризуется в общей сложности не более чем 2 (например, не более чем 1) аминокислотными различиями в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 аминокислотных различий на CDR. В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела характеризуется в общей сложности не более чем 2 (например, не более чем 1) аминокислотными различиями в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 1 аминокислотного различия на CDR.

Аминокислотное различие может представлять собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В одном варианте осуществления аминокислотное различие представляет собой консервативную аминокислотную замену, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела содержит те же каркасные последовательности, что и иллюстративные антитела, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления функциональный вариант антитела может содержать каркасную область, характеризующуюся не более чем 2 или не более чем 1 аминокислотным различием (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью). Таким образом, каждая каркасная область может характеризоваться не более чем 2 или не более чем 1 аминокислотным различием (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью).

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела может характеризоваться в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотными различиями в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 (например, не более 1) аминокислотных различий на каркасную область. В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела характеризуется в общей сложности не более чем 2 (например, не более чем 1) аминокислотными различиями в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 аминокислотных различий на каркасную область. В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела характеризуется в общей сложности не более чем 2 (например, не более чем 1) аминокислотными различиями в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 1 аминокислотного различия на каркасную область.

Таким образом, функциональный вариант антитела может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано в данном документе, где:

тяжелая цепь характеризуется не более чем 14 аминокислотными различиями (не более чем 2 аминокислотными различиями в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотными различиями в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью тяжелой цепи, описанной в данном документе (например, под SEQ ID NO: 7), и

легкая цепь характеризуется не более чем 14 аминокислотными различиями (не более чем 2 аминокислотными различиями в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотными различиями в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью легкой цепи, описанной в данном документе (например, под SEQ ID NO: 8);

где функциональный вариант антитела связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и/или где функциональный вариант антитела проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

Указанные варианты тяжелых или легких цепей могут называться "функциональными эквивалентами" эталонных тяжелых или легких цепей.

В одном варианте осуществления функциональный вариант антитела может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано в данном документе, где:

тяжелая цепь характеризуется не более чем 7 аминокислотными различиями (не более чем 1 аминокислотным различием в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотным различием в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью тяжелой цепи в данном документе (например, под SEQ ID NO: 7), и

легкая цепь характеризуется не более чем 7 аминокислотными различиями (не более чем 1 аминокислотным различием в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотным различием в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью легкой цепи в данном документе (например, под SEQ ID NO: 8);

где функциональный вариант антитела связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и/или где функциональный вариант антитела проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА (например ВСМА человека) с константой диссоциации (KD), составляющей  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 10$  пМ,  $\leq 1$  пМ или  $\leq 0,1$  пМ. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА (например ВСМА человека) с KD, составляющей от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 40 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 30 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 20 нМ или от приблизительно 1,5 нМ до приблизительно 20 нМ. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА (например ВСМА человека) с KD, составляющей от приблизительно 23 нМ до приблизительно 27 нМ. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА (например ВСМА человека) с KD, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 1,5 нМ. Измерения KD (аффинности связывания) можно проводить посредством любого подходящего анализа, известного из уровня техники. К таким способам относятся, например, сортировка клеток с активацией флуоресценции (FACS), поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore, ProteOn), биослойная интерферометрия (BLI, например Octet), анализ кинетического исключения (например KinExA), отделяемые шарики (например магнитные гранулы), антиген для пэннинга, ELISA и/или системы ForteBio Octet. К подходящим анализам кинетического исключения относится система KinExA (например, KinExA 3100, KinExA 3200 или KinExA 4000) (Sapidyne Instruments, Айдахо).

Преимущественно данная терапевтическая комбинация обеспечивает целенаправленное применение таких ингибиторов протеасом для нацеливания на клетки, которые в норме не реагируют (например устойчивы) на такие ингибиторы протеасом. Например, авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что ингибитор протеасомы (например бортезомиб) усиливает активность ADC в отношении В-клеточных злокачественных новообразований, даже если В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к ингибитору протеасомы (см. пример 3).

Таким образом, настоящее изобретение охватывает введение ADC в комбинации с ингибитором протеасомы с дозой ингибитора протеасомы, которая в ином случае обеспечивает лишь

низкую/слабую супрессию В-клеточного злокачественного новообразования, таким образом, что после указанного добавления комбинация теперь способна демонстрировать улучшенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования. Следовательно, настоящее изобретение предусматривает "перепрофилирование" ингибитора протеасомы (например бортезомиба) для применения в качестве усиливающего средства для ADC, в отличие от применения (отдельного) средства монотерапии (которое в ином случае не было бы эффективным в отношении устойчивых злокачественных новообразований).

Аналогичным образом, настоящее изобретение охватывает введение ингибитора протеасомы в комбинации с ADC с дозой ADC, которая в ином случае обеспечивает лишь низкую/слабую супрессию В-клеточного злокачественного новообразования, таким образом, что после указанного добавления комбинация теперь способна демонстрировать улучшенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования. Следовательно, настоящее изобретение предусматривает "перепрофилирование" ADC для применения в качестве усиливающего средства для ингибитора протеасомы, в отличие от применения (отдельного) средства монотерапии (которое в ином случае не было бы эффективным в отношении В-клеточного злокачественного новообразования, экспрессирующего низкий уровень антигена ВСМА).

Таким образом, в одном варианте осуществления В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к ингибитору протеасомы (например к лекарственному препарату, содержащему ингибитор протеасомы в отсутствие ADC по настоящему изобретению). В одном варианте осуществления указанный ингибитор протеасомы представляет собой бортезомиб.

В одном варианте осуществления В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к ADC по настоящему изобретению (например к лекарственному препарату, содержащему ADC в отсутствие ингибитора протеасомы по настоящему изобретению). В одном варианте осуществления В-клеточное злокачественное новообразование, которое является устойчивым к ADC по настоящему изобретению, характеризуется наличием злокачественной В-клетки, не характеризующейся повышением или снижением уровня экспрессии антигена ВСМА по сравнению с эталонной незлокачественной В-клеткой.

Также было показано, что терапевтическая комбинация обладает повышенной активностью в отношении В-клеточного злокачественного новообразования, которое является устойчивым к ряду других распространенных противораковых лекарственных средств (см. пример 3). Таким образом, в одном варианте осуществления В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к одному или нескольким лекарственным средствам, выбранным из дексаметазона, леналидомида, помалидомида, бортезомиба или их комбинации.

Кроме того, из-за синергического характера комбинации можно применять более низкие дозы составных компонентов, таким образом снижая риск развития устойчивости (фундаментальной угрозы общественному здоровью) к любому из составных компонентов вследствие чрезмерного применения. Действительно, настоящее изобретение снижает потребность в назначении схем длительного лечения. Например, авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что *in vivo* эффективность субоптимальных доз ADC все еще повышена при введении в комбинации с ингибитором протеасомы (например бортезомибом).

Поэтому в одном варианте осуществления ADC и/или ингибитор протеасомы вводятся в субоптимальной дозе.

Порядок применения/введения составных компонентов терапевтической комбинации может варьироваться. ADC и ингибитор протеасомы можно вводить одновременно (например, оба в их собственной конкретной оптимальной дозе для достижения синергии) либо в качестве части одной композиции, либо в отдельных композициях. Например, ADC может присутствовать в первой композиции (например, адаптированной для внутривенного введения субъекту), а ингибитор протеасомы может присутствовать во второй композиции (например, адаптированной для внутривенного, подкожного или перорального введения субъекту). Например, если ингибитор протеасомы представляет собой бортезомиб, то указанная вторая композиция может быть адаптирована для внутривенной или подкожной инъекции. В вариантах осуществления, в которых ингибитор протеасомы представляет собой иксазомиб, указанная вторая композиция может быть дополнительно или в качестве альтернативы адаптирована для перорального введения.

Более того, ADC и ингибитор протеасомы можно вводить в разные моменты времени (например, ингибитор протеасомы может быть предварительно введен для сенсibilизации злокачественной В-клетки к ADC). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления ADC и ингибитор протеасомы вводятся субъекту в разные моменты времени в отдельных композициях.

В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы вводится перед введением ADC. В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы вводится одновременно с ADC. В одном варианте осуществления ингибитор протеасомы вводится последовательно с ADC.

Используемый в данном документе термин "лечить" или "лечение" охватывает профилактическое лечение (например, для предупреждения возникновения В-клеточного злокачественного новообразования), а также корректирующее лечение (лечение субъекта, уже страдающего В-клеточным злокачественным новообразованием). В одном варианте осуществления используемый в данном документе термин "лечить" или "лечение" означает корректирующее лечение. Термин "лечить" или "лечение" охватывает лечение как В-клеточного злокачественного новообразования,

так и его симптома. В некоторых вариантах осуществления "лечить" или "лечение" относится к симптому В-клеточного злокачественного новообразования.

Следовательно, лекарственный препарат и/или терапевтическую комбинацию можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве или профилактически эффективном количестве.

"Терапевтически эффективное количество" представляет собой любое количество лекарственного препарата и/или терапевтической комбинации, которое при введении отдельно или в комбинации субъекту для лечения В-клеточного злокачественного новообразования (или его симптома) является достаточным для осуществления такого лечения В-клеточного злокачественного новообразования или его симптома.

"Профилактически эффективное количество" представляет собой любое количество лекарственного препарата и/или терапевтической комбинации, которое при введении отдельно или в комбинации субъекту подавляет или задерживает возникновение или повторное возникновение В-клеточного злокачественного новообразования (или его симптома). В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает возникновение или повторное возникновение В-клеточного злокачественного новообразования. "Подавление" возникновения означает либо снижение вероятности возникновения В-клеточного злокачественного новообразования (или его симптома), либо полное предотвращение его возникновения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает *in vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ADC, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (а) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, в комбинации с (b) ингибитором протеасомы.

В другом аспекте предусмотрен *in vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ингибитора протеасомы, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (а) ингибитором протеасомы в комбинации с (b) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты.

Термин "супрессирует" или "супрессия" в контексте любого лекарственного препарата, способа или применения, описанных в данном документе, охватывает "подавление роста", "подавление

пролиферации" или "уничтожение" злокачественной В-клетки. Упоминание "злокачественной В-клетки" охватывает "опухоль, содержащую злокачественную В-клетку".

Термины "подавляет" или "подавление" являются синонимами термина "замедляет рост" или "останавливает пролиферацию" злокачественной В-клетки или "замедляет рост" опухоли, содержащей злокачественную В-клетку. В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация по настоящему изобретению может "уничтожить" злокачественную В-клетку или "использоваться для уничтожения" злокачественной В-клетки или опухоли, содержащей злокачественную В-клетку. Термин "супрессия" также охватывает предотвращение роста (например пролиферации) злокачественной В-клетки или опухоли, содержащей злокачественную В-клетку.

В одном варианте осуществления повышенная супрессия В-клеточного злокачественного новообразования может предусматривать одно или несколько проявлений супрессии, выбранных из повышенного замедления роста опухоли, повышенного уменьшения размера опухоли, повышенного снижения метастазирования опухоли, повышенного показателя выживаемости субъекта, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, или их комбинации. В одном варианте осуществления повышенная супрессия В-клеточного злокачественного новообразования предусматривает одно или несколько проявлений супрессии, выбранных из повышенного замедления роста опухоли, повышенного уменьшения размера опухоли или их комбинации.

В одном варианте осуществления лекарственный препарат и/или терапевтическая комбинация по настоящему изобретению супрессируют В-клеточное злокачественное новообразование на по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или на приблизительно 100% сильнее, чем идентичные в остальном лекарственный препарат и/или композиция, но без ингибитора протеасомы. В одном варианте осуществления лекарственный препарат и/или терапевтическая комбинация по настоящему изобретению супрессируют В-клеточное злокачественное новообразование на по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или на приблизительно 100% сильнее, чем идентичные в остальном лекарственный препарат и/или композиция, но без ADC по настоящему изобретению.

Супрессию можно измерить посредством измерения клеточной пролиферации, которую можно анализировать с применением известных из уровня техники методик, которые позволяют измерять скорость деления клеток и/или долю клеток в популяции клеток, проходящих клеточное деление,

и/или скорость утраты клеток из популяции клеток в связи с терминальной дифференцировкой или гибелью клеток (например включение тимидина).

Оценка указанной "повышенной супрессии В-клеточного злокачественного новообразования" продемонстрирована посредством ссылки на прилагаемые примеры и может быть оценена с применением методологии, описанной в разделе "Примеры" (например, в примере 3). Например, в примере 3 описан способ, включающий ФМС-анализ на основе аннексина V/PI, который позволяет измерять значение "наблюдаемого % апоптотических клеток" в *in vitro* культуре злокачественных В-клеток после контакта с тестируемым образцом. Это позволяет проводить прямое сравнение супрессии В-клеточных злокачественных новообразований между лекарственным препаратом по настоящему изобретению и идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без ингибитора протеасомы или ADC.

В одном варианте осуществления считается, что супрессия В-клеточного злокачественного новообразования повышается, если значение "наблюдаемого % апоптотических клеток", полученное для комбинации двух основных активных соединений (например ADC по настоящему изобретению и ингибитора протеасомы), превышает значение "наблюдаемого % апоптотических клеток", полученное при отсутствии либо ADC по настоящему изобретению, либо ингибитора протеасомы (предпочтительно ингибитора протеасомы) (но в иных идентичных условиях).

Таким образом, в одном варианте осуществления повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования можно определить посредством сравнения значения "наблюдаемого % апоптотических клеток", полученного для комбинации ADC по настоящему изобретению и ингибитора протеасомы, с полученным значением "наблюдаемого % апоптотических клеток" для такого же состава (например лекарственного препарата) в отсутствие ADC по настоящему изобретению или ингибитора протеасомы (предпочтительно без ингибитора протеасомы) в тех же условиях.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования, которая на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% выше (наблюдаемый % апоптотических клеток), чем наблюдаемый % апоптотических клеток, полученный с помощью того же состава (например лекарственного препарата) в отсутствие ADC по настоящему изобретению или ингибитора протеасомы (предпочтительно без ингибитора протеасомы) в тех же условиях. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования, которая на по меньшей мере приблизительно 65% выше (наблюдаемый % апоптотических клеток), чем наблюдаемый % апоптотических клеток, полученный с помощью того же состава (например

лекарственного препарата) в отсутствие ADC по настоящему изобретению или ингибитора протеасомы (предпочтительно без ингибитора протеасомы) в тех же условиях.

В одном варианте осуществления комбинация ADC по настоящему изобретению и ингибитора протеасомы может проявлять синергическую супрессию В-клеточного злокачественного новообразования.

Используемый в данном документе термин "синергический" означает, что проявляемая супрессия В-клеточного злокачественного новообразования превышает сумму его частей. Иными словами, супрессия В-клеточного злокачественного новообразования превышает аддитивную.

Синергизм можно измерить посредством определения "показателя аддитивности" (CI) с применением инструментов для анализа, таких как CompuSyn (ComboSyn, Inc.), в котором  $CI < 1$  указывает на синергизм между комбинацией основных активных компонентов по настоящему изобретению,  $CI > 1$  указывает на антагонизм, а CI, составляющий 1, указывает на то, что эффект является аддитивным. Указанный CI можно измерить посредством сравнения эффективности в любом анализе жизнеспособности клеток, известном из уровня техники (например, в качестве альтернативы или в дополнение к методологии из примеров 1-3, например в анализе "жизнеспособности клеток на основе CellTiter-Glo", описанном в примере 3), композиции, содержащей лекарственный препарат/терапевтическую комбинацию по настоящему изобретению, с эффективностью в остальном идентичной композиции, но без ADC по настоящему изобретению или ингибитора протеасомы (предпочтительно без ингибитора протеасомы).

Ссылаясь на раздел "Примеры" (например на пример 3), синергическую супрессию В-клеточного злокачественного новообразования можно считать присутствующей, если CI составляет менее чем приблизительно 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1 или 0,05. В одном варианте осуществления указанный CI может составлять менее чем приблизительно 0,7. В одном варианте осуществления указанный CI может составлять менее чем приблизительно 0,6.

В одном варианте осуществления "анализ жизнеспособности клеток" предусматривает инкубацию тестируемого образца, содержащего злокачественные В-клетки, в присутствии определенного количества композиции, содержащей терапевтическую комбинацию (ADC по настоящему изобретению и ингибитор протеасомы), и сравнение количества нежизнеспособных клеток (например апоптотических клеток) в тестируемом образце после инкубации (например через по меньшей мере 0,5, 1, 1,5 или 2 дня инкубации) с количеством нежизнеспособных клеток в инкубируемом контрольном образце в присутствии идентичной в остальном композиции, но без (а)

указанного ингибитора протеасомы или (b) указанного ADC (предпочтительно без указанного ингибитора протеасомы).

В одном варианте осуществления терапевтическая комбинация вводится субъекту. Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения субъекта-млекопитающего. В одном варианте осуществления "субъект" является человеком, животным-компаньоном (например домашним животным, таким как собака, кошка и/или кролик), сельскохозяйственным животным (например, свиньей, овцой, крупным рогатым скотом и/или козой) и/или лошадью. В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В способах по настоящему изобретению у субъекта ранее может быть не диагностировано наличие В-клеточного злокачественного новообразования. В качестве альтернативы, у субъекта ранее может быть диагностировано наличие В-клеточного злокачественного новообразования. Субъект также может быть субъектом, у которого проявляются факторы риска развития заболевания, или субъектом, у которого не проявляются симптомы В-клеточного злокачественного новообразования. Субъект также может быть субъектом, который страдает В-клеточным злокачественным новообразованием или характеризуется риском его развития. В одном варианте осуществления субъекту ранее было введено средство терапии для лечения В-клеточного злокачественного новообразования.

В одном варианте осуществления способы и пути применения по настоящему изобретению предусматривают одну или несколько стадий введения, выбранного из перорального, внутривенного, внутриартериального, интраперитонеального, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального, ингаляционного, местного или их комбинации. В одном варианте осуществления введение представляет собой одно или несколько путей введения, выбранных из внутривенного, внутриартериального (например путем инъекции или с применением капельницы), подкожного введения или их комбинации.

#### Получение антител

Антитела по настоящему изобретению можно получать с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и их полезность подтверждена традиционными исследованиями связывания – иллюстративный способ описан в примере 2. Например, простой анализ связывания заключается в инкубации клетки, экспрессирующей антиген, с антителом. Если антитело помечено флуорофором, связывание антитела с антигеном можно выявить посредством FACS-анализа.

Способы получения антител к ВСМА и их фрагментов антител по настоящему изобретению описаны в WO 2010/104949 и WO 2019/025983 (в частности, в WO 2019/025983), обе из которых

включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела по настоящему изобретению могут вырабатываться у различных животных, в том числе мышей, крыс, кроликов, коз, овец, обезьян или лошадей. Антитела могут вырабатываться после иммунизации отдельными капсульными полисахаридами или множеством капсульных полисахаридов. Кровь, выделенная из организма таких животных, содержит поликлональные антитела – множественные антитела, которые связываются с одним и тем же антигеном. Антигены также можно вводить цыплятам для получения поликлональных антител в яичном желтке. Для получения моноклонального антитела, которое является специфическим в отношении одного эпитопа антигена, секретирующие антитела лимфоциты выделяются из организма животного и подвергаются иммортализации посредством слияния их с линией раковых клеток. Слитые клетки называются гибридомами, и они будут постоянно расти и секретировать антитело в культуре. Отдельные клетки гибридомы выделяются посредством клонирования с разбавлением для получения клонов клеток, все из которых продуцируют одно и то же антитело; эти антитела называются моноклональными антителами. Способы получения моноклональных антител являются традиционными методиками, известными специалистам в данной области техники (см., например, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*. GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280). Поликлональные и моноклональные антитела часто очищают посредством аффинной хроматографии с применением белка A/G или антигена.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получить в виде моноклонального антитела, которое можно получить с применением гибридомных способов, таких как способы, описанные в Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975). При применении гибридомного способа мышь, хомячок или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют, как описано выше, чтобы вызвать продуцирование лимфоцитами антител, которые будут специфически связываться с иммунизирующим антигеном. Лимфоциты также можно иммунизировать *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяются и сливаются с подходящей линией клеток миеломы, например, с применением полиэтиленгликоля, с образованием клеток гибридомы, которые затем можно выборочно отделить от неслитых лимфоцитов и клеток миеломы. Гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, специфически направленные против выбранного антигена, как определено посредством иммунопреципитации, иммуноблоттинга или анализа связывания *in vitro*, например радиоиммуноанализа (RIA) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), затем можно размножить либо в культуре *in vitro* с применением стандартных способов (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) либо *in vivo* в виде асцитных опухолей в организме животного. Затем моноклональные антитела можно очистить из культуральной среды или асцитной жидкости с применением известных способов.

В качестве альтернативы, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например в виде моноклональных антител) также можно получить с применением способов рекомбинантных ДНК, как описано в патенте США № 4816567. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяются из зрелых В-клеток или клетки гибридомы, например посредством RT-PCR с применением олигонуклеотидных праймеров, которые позволяют специфически амплифицировать гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, и их последовательность определяется с применением традиционных процедур. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем клонируются в подходящие векторы экспрессии, которые при трансфекции ими клеток-хозяев, таких как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в других случаях не продуцируют белок иммуноглобулин, обеспечивают выработку моноклональных антител клетками-хозяевами. Также рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты требуемых видов можно выделить из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих CDR требуемых видов, как описано в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, можно дополнительно модифицировать посредством ряда различных способов с применением технологии рекомбинантных ДНК для получения альтернативных антител. В некоторых вариантах осуществления константные домены легкой и тяжелой цепей, например, из мышинового моноклонального антитела, можно заменить (1) на такие области, например, из человеческого антитела, с получением химерного антитела или (2) на отличный от иммуноглобулина полипептид с получением слитого антитела. В некоторых вариантах осуществления константные области подвергаются усечению или удалению с получением требуемого фрагмента антитела из моноклонального антитела. Для оптимизации специфичности, аффинности и т. п. моноклонального антитела можно использовать сайт-направленный мутагенез или мутагенез высокой плотности в отношении вариабельной области.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Человеческие антитела можно получать непосредственно с применением различных методик, известных из уровня техники. Можно получать иммортализованные В-лимфоциты человека, иммунизированные *in vitro* или выделенные из организма иммунизированного индивидуума, у которого продуцируется антитело, направленное против антигена-мишени. См., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voemer et al., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); патент США № 5750373.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно отобрать из фаговой библиотеки, где в такой фаговой библиотеке экспрессируются человеческие антитела, как описано, например, в Vaughan et al., *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991), и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991). Методики получения и применения фаговых библиотек антител также описаны в патентах США №№ 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 и 7264963, а также в Rothe et al., *J. Molec. Biol.*, 376:1182-1200 (2008), каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Стратегии созревания аффинности и стратегии перестановки цепей известны из уровня техники и могут применяться для получения высокоаффинных человеческих антител или их антигенсвязывающих фрагментов. См. Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783 (1992), включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например моноклональное антитело) могут представлять собой гуманизованное антитело. Можно также использовать способы конструирования, гуманизации или изменения поверхности отличных от человеческих или человеческих антител, и они широко известны из уровня техники. Гуманизованное, имеющее измененную поверхность или подобным образом сконструированное антитело может содержать один или несколько аминокислотных остатков из источника, отличного от человека, например без ограничения мыши, крысы, кролика, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего. Эти аминокислотные остатки, отличные от человеческих, заменяются остатками, часто называемыми "импортируемыми" остатками, которые обычно взяты из "импортируемого" переменного, константного или другого домена известной человеческой последовательности. Такие импортируемые последовательности можно использовать для снижения иммуногенности или снижения, повышения или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, времени полужизни или любых других подходящих характеристик, известных из уровня техники. Предпочтительно, остатки CDR могут непосредственно и в наиболее существенной степени участвовать во влиянии на связывание с антигеном (например ВСМА). Соответственно, часть отличных от человеческих или человеческих последовательностей CDR или все они могут сохраняться, тогда как отличные от человеческих последовательности переменных и константных областей могут быть заменены человеческими или другими аминокислотами.

Антитела также необязательно можно гуманизовать, подвергать изменению поверхности, конструировать или человеческие антитела можно конструировать с сохранением высокой аффинности в отношении антигена (например ВСМА) и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения данной цели гуманизованные (или человеческие) или

сконструированные антитела и антитела с измененной поверхностью можно необязательно получать посредством способа анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных и сконструированных продуктов с применением трехмерных моделей исходных, сконструированных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, в которых иллюстрируются и отображаются возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Рассмотрение этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, т. е. проанализировать остатки, которые оказывают влияние на способность кандидатного иммуноглобулина связывать его антиген (например ВСМА). Таким образом, остатки FW можно выбирать и комбинировать из консенсусной и импортированной последовательностей таким образом, чтобы обеспечить требуемые характеристики антитела, такие как повышенная аффинность в отношении антигена-мишени(антигенов-мишеней).

Гуманизацию, изменение поверхности или конструирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению можно выполнять с применением любого известного способа, такого как без ограничения способы, описанные в Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); патентах США №№ 5639641, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, 7557189, 7538195 и 7342110; международных заявках №№ PCT/US98/16280, PCT/US96/18978, PCT/US91/09630, PCT/US91/05939, PCT/US94/01234, PCT/GB89/01334, PCT/GB91/01134, PCT/GB92/01755, публикациях международных патентных заявок №№ WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430 и публикации европейской патентной заявки № EP 229246, каждая из которых во всей своей полноте включена в данный документ посредством ссылки, включая упоминаемые в них литературные источники.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно получать в организме трансгенных мышей, содержащих локусы человеческих иммуноглобулинов, которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенных иммуноглобулинов. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016.

В одном варианте осуществления предусмотрен фрагмент (например фрагмент антитела) антитела по настоящему изобретению. Известны различные методики получения фрагментов антител.

Термины "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент," "функциональный фрагмент антитела" и "антигенсвязывающая часть" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к одному или нескольким фрагментам или частям антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например ВСМА), с которым связывается антитело (например "полное" или "исходное" антитело). Следовательно, упоминание выражения "его антигенсвязывающий фрагмент" означает антигенсвязывающий фрагмент, который связывает ВСМА (например фрагмент антитела, связывающий антиген ВСМА).

Традиционно данные фрагменты получают посредством протеолитического расщепления интактных антител, как описано, например, в Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993) и Brennan et al., Science 229:81 (1985). В одном варианте осуществления фрагменты антител к ВСМА получают рекомбинантным путем. Все Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться *E. coli* или другими клетками-хозяевами, что таким образом обеспечивает получение больших количеств данных фрагментов. Такие фрагменты антител к ВСМА также можно выделять из рассмотренных выше фаговых библиотек антител. Фрагменты антител к ВСМА также могут представлять собой линейные антитела, описанные в патенте США № 5641870. Другие методики получения фрагментов антител будут очевидны практикующему специалисту.

Модифицированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, могут содержать переменную область любого типа, которая обеспечивает связывание антитела или полипептида с ВСМА. В связи с этим переменная область может содержаться в организме млекопитающего любого типа или может быть получена из него, у которого могут быть индуцированы гуморальный ответ и выработка иммуноглобулинов против требуемого антигена. Так, переменная область антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить, например, от человека, мыши, примата, отличного от человека (например, яванских макаков, макаков и т. п.), или представителя семейства волчьих. В одном варианте осуществления как переменные, так и константные области модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются человеческими. В одном варианте осуществления переменные области совместимого антитела (обычно полученные из источника, отличного от человека) можно конструировать или специфически оптимизировать с целью улучшения свойств связывания или снижения иммуногенности молекулы. В связи с этим переменные области, применимые в настоящем изобретении, можно гуманизировать или иным образом изменять посредством включения импортируемых аминокислотных последовательностей.

В одном варианте осуществления переменные домены как тяжелых, так и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изменены посредством по меньшей мере частичной замены одной или нескольких CDR и/или посредством частичной замены каркасной области и

изменения последовательности. Хотя CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предусматривается, что CDR будут получены из антитела другого класса и в определенных вариантах осуществления из антитела от другого вида. Для передачи антигенсвязывающей способности одного переменного домена другому замена всех CDR полными CDR из донорной переменной области не является необходимой. Напротив, необходимым является только перенос тех остатков, которые являются необходимыми для поддержания активности антигенсвязывающего сайта. С учетом пояснений, изложенных в патентах США №№ 5585089, 5693761 и 5693762, получение функционального антитела со сниженной иммуногенностью посредством проведения стандартных экспериментов будет находиться вполне в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Без учета изменений в переменной области специалистам в данной области техники будет понятно, что модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению будут предусматривать антитело (например полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), в котором по меньшей мере часть одного или нескольких доменов константной области была подвергнута делеции или иным образом изменена с получением требуемых биохимических характеристик, таких как повышенная локализация в опухоли или сокращенное время полужизни в сыворотке крови, по сравнению с антителом с примерно такой же иммуногенностью, содержащим нативную или неизмененную константную область. В одном варианте осуществления константная область модифицированного антитела будет предусматривать человеческую константную область. К модификациям константной области, совместимым с настоящим изобретением, относятся добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах. То есть раскрытое в данном документе модифицированное антитело может предусматривать изменения или модификации одного или нескольких из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или константного домена легкой цепи (CL). В одном варианте осуществления предполагается модифицированная константная область, где один или несколько доменов частично или полностью подвергнуты делеции. В одном варианте осуществления модифицированное антитело будет предусматривать конструкции с подвергнутым делеции доменом или варианты, где был удален весь CH2-домен ( $\Delta$ CH2-конструкции). В одном варианте осуществления исключенный домен константной области может быть замещен коротким аминокислотным спейсером (например из 10 остатков), который обеспечивает некоторую гибкость молекулы, которую обычно придает отсутствие константной области.

Наряду с делецией целых доменов константной области антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, можно модифицировать посредством частичной делеции или замены нескольких аминокислот или даже одной аминокислоты в константной области. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных областях CH2-домена может быть

достаточно, чтобы в значительной степени ослабить связывание Fc и таким образом повысить локализацию в опухолях. Аналогичным образом, один или несколько доменов константной области, которые контролируют эффекторную функцию (например связывание C1Q комплемента), могут быть полностью или частично подвергнуты делеции. Такие частичные делеции константных областей могут обеспечивать улучшение выбранных характеристик антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например время полужизни в сыворотке крови), сохраняя при этом другие требуемые функции, ассоциированные с соответствующим доменом константной области, в неизменном виде. Более того, константные области антитела и его антигенсвязывающего фрагмента можно модифицировать посредством мутации или замены одной или нескольких аминокислот, что улучшает профиль полученной конструкции. В связи с этим можно нарушать активность, обеспечиваемую консервативным сайтом связывания (например связывания Fc), при этом в значительной степени сохраняя конфигурацию и иммуногенный профиль модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления может быть осуществлено добавление одной или нескольких аминокислот к константной области с улучшением требуемых характеристик, таких как ослабление или усиление эффекторной функции или обеспечение присоединения большего количества цитотоксинов или углеводов. В одном варианте осуществления могут потребоваться вставка или повторение специфических последовательностей, полученных из выбранных доменов константной области.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает варианты и эквиваленты, которые в значительной степени гомологичны антителу или антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению (например, мышшиное, химерное, гуманизованное или человеческое антитело или их антигенсвязывающие фрагменты). Они могут характеризоваться, например, мутациями в виде консервативных замен, т. е. замены одной или нескольких аминокислот на сходные аминокислоты. Например, консервативная замена относится к замене аминокислоты на другую из того же общего класса, как, например, одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту, одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или одной нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту. Из уровня техники широко известно, что подразумевается под консервативной заменой аминокислоты.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы они содержали дополнительные химические фрагменты, не являющиеся в обычных условиях частью белка. Данные дериватизированные фрагменты могут улучшать растворимость, биологическое время полужизни или абсорбцию белка. Данные фрагменты могут также снижать или устранять любые требуемые побочные эффекты белков и т. п. Обзор таких фрагментов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

## ГОМОЛОГИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Для определения процента идентичности можно использовать любой из множества способов выравнивания последовательностей, в том числе без ограничения глобальные способы, локальные способы и гибридные способы, такие как, например, способы сегментного подхода. Протоколы для определения процента идентичности являются стандартными процедурами в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Глобальные способы позволяют выравнивать последовательности от начала до конца молекулы и определять наилучшее выравнивание посредством добавления баллов отдельных пар остатков и посредством применения штрафов за гэпы. К неограничивающим способам относятся, например, CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994), и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Локальные способы позволяют выравнивать последовательности посредством идентификации одного или нескольких консервативных мотивов, общих для всех вводимых последовательностей. К неограничивающим способам относятся, например, Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) *CABIOS* 501-509 (1992); генерация выборки по схеме Гиббса, см., например, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) *Science* 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

Таким образом, процент идентичности последовательностей определяется традиционными способами. См., например, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-16, 1986, и Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-19, 1992. Вкратце, две аминокислотные последовательности выравнивают для оптимизации баллов выравнивания с применением штрафа за открытие гэпа, составляющего 10, штрафа за удлинение гэпа, составляющего 1, и матрицы замен "blosum 62" из публикации Henikoff и Henikoff (там же), как показано ниже (аминокислоты обозначаются стандартными однобуквенными кодами).

"Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей. Таким образом, % идентичности можно рассчитать как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. При расчетах % идентичности последовательностей также можно учитывать количество гэпов и длину каждого гэпа, который необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнения последовательностей

и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с применением специализированных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые будут знакомы специалисту в данной области техники.

В значительной степени гомологичные полипептиды характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных замен, делеций или добавлений. Такие изменения предпочтительно носят незначительный характер, то есть представляют собой консервативные аминокислотные замены (см. ниже) и другие замены, которые не оказывают значительного влияния на фолдинг или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до приблизительно 30 аминокислот, и небольшие удлинения на аминоконце или карбоксильном конце, такие как аминоконцевой остаток метионина, небольшой линкерный пептид до приблизительно 20-25 остатков или аффинная метка.

### КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

Основные:	аргинин
	лизин
	гистидин
Кислые:	глутаминовая кислота
	аспарагиновая кислота
Полярные:	глутамин
	аспарагин
Гидрофобные:	лейцин
	изолейцин
	валин
Ароматические:	фенилаланин
	триптофан
	тирозин
Небольшого размера:	глицин
	аланин
	серин
	треонин
	метионин

В дополнение к 20 стандартным аминокислотам аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаляновая кислота, изовалин и  $\alpha$ -метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, и

неприродных аминокислот. Полипептиды по настоящему изобретению также могут содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки.

Аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, не встречающихся в природе аминокислот и неприродных аминокислот.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах по настоящему изобретению можно идентифицировать согласно процедурам, известным из уровня техники, таким как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия также могут быть определены посредством физического анализа структуры, как определено посредством таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутацией предполагаемых аминокислот сайта контакта. См., например, de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Значения идентичности незаменимых аминокислот также могут быть выведены из анализа гомологий со связанными компонентами (например, транслокационными или протеазными компонентами) полипептидов по настоящему изобретению.

Множественные аминокислотные замены могут быть осуществлены и протестированы с применением известных способов мутагенеза и скрининга, таких как способы, раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, данные авторы раскрывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора функционального полипептида и последующего секвенирования подвергнутых мутагенезу полипептидов с определением спектра допустимых замен в каждом положении. К другим способам, которые можно использовать, относятся фаговый дисплей (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) специалист в данной области техники найдет общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение не ограничено иллюстративными способами и материалами, раскрытыми в данном документе, и при осуществлении на практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновой кислоты записываются слева направо в 5'-3'-ориентации; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу соответственно.

Заголовки, предусмотренные в данном документе, не ограничивают различные аспекты или варианты осуществления настоящего изобретения.

В данном документе для обозначения аминокислот используются название аминокислоты, трехбуквенное сокращение или однобуквенное сокращение. Используемый в данном документе термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в данном документе термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент". Термины "белок" и "полипептид" в данном документе используются взаимозаменяемо. В настоящем изобретении и в формуле изобретения могут использоваться традиционные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. 3-буквенный код для аминокислот определен в соответствии с Объединенной комиссией IUPACIUB по биохимической номенклатуре (JCBN). Также понятно, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

На протяжении описания могут встречаться другие определения терминов. Прежде чем описывать иллюстративные варианты осуществления более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления и поэтому они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая, поскольку объем настоящего изобретения будет определяться исключительно прилагаемой формулой изобретения.

Если предусмотрен диапазон значений, подразумевается, что также конкретно раскрыто каждое промежуточное значение до десятых долей единицы нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределами данного диапазона. Объемом настоящего изобретения охватывается каждый меньший диапазон между любым заданным значением или промежуточным значением в заданном диапазоне и любым другим заданным или промежуточным

значением в данном заданном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в который включены один из пределов, ни один из них или оба из них, включен в меньшие диапазоны и также охватывается объемом настоящего изобретения с учетом любого специально исключенного предела в заданном диапазоне. Если заданный диапазон включает один или оба предела, в настоящее изобретение также включены диапазоны, исключаящие любой предел или оба данных включенных предела.

Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "цитотоксин" включает множество таких цитотоксинов, и ссылка на "цитотоксин" включает ссылку на один или несколько цитотоксинов и их эквивалентов, которые известны специалистам в данной области техники, и так далее.

Рассматриваемые в данном документе публикации приведены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно толковаться как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники по отношению к прилагаемой формуле изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

Теперь настоящее изобретение будет описано, исключительно в качестве примера, со ссылкой на следующие примеры.

#### МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

##### Получение антител к ВСМА

Антитела получали, как описано в WO 2010/104949 и WO 2019/025983, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки. Подходящие антитела получали, как описано в Kinneer et al (2018), *Leukemia* 33, 766-771 и WO 2019/025983.

##### Получение ADC к ВСМА

ADC к ВСМА (антитело к ВСМА, конъюгированное с PBD, в данном документе обозначено как "M2") получали посредством сайт-специфической конъюгации димера PBD, тезирина (SG3249), с антителом ВСМА-Ab1, описанным в Kinneer et al (2018), *Leukemia* 33, 766-771 ("Kinneer et al (2018)"), с применением расщепляемого протеазой линкера, как описано ранее (см., например, Kinneer et al (2018); включенную в данный документ посредством ссылки). Иллюстративным антителом к ВСМА является ВСМА-Ab2, также описанное в Kinneer et al (2018). Указанные антитела дополнительно описаны в WO 2019/025983 (включенной в данный документ посредством

ссылки) как 15B2GL и J6M0-мс соответственно. ADC "M3" получали аналогичным образом посредством присоединения полезной нагрузки, представляющей собой монометилауристатин F (ММАF), к антителу ВСМА-Ab1. Обе полезные нагрузки сайт-специфически конъюгировали со сконструированным цистеином, вставленным после положения 239 (С239i) в СН2-домене антитела к ВСМА, как описано ранее. Вкратце, ВСМА-Ab1 восстанавливали 40-молярным избытком ТСЕР в течение трех часов при 37°C с последующими тремя последовательными процедурами диализа с удалением ТСЕР. Затем антитело окисляли 20-молярным избытком ДНАА в течение четырех часов при комнатной температуре и конъюгировали с применением восьми молярных эквивалентов полезной нагрузки. После конъюгации свободную полезную нагрузку и белковый агрегат удаляли посредством очистки с применением керамического гидроксипатита.

#### Мышиная модель ксенотрансплантата человеческой ММ

Все эксперименты на животных были одобрены и соответствовали релевантным регуляторным стандартам Институционального комитета по содержанию и использованию животных при Институте рака Дана-Фарбер. Мышам SCID СВ-17 подкожно инокулировали  $5,0 \times 10^6$  клеток ММ.1S в 100 мкл среды RPMI 1640 без сыворотки крови. Когда опухоли можно было измерить примерно через 3 недели после инъекции ММ-клеток, мышей (8 мышей/группа) рандомизировали и обрабатывали только средой-носителем, M2, btz или M2 с btz. Размер опухоли измеряли один раз в три дня в 2 измерениях с применением штангенциркуля и объем опухоли рассчитывали с применением следующей формулы:  $V = 0,5a \times b^2$ , где "a" и "b" обозначают длинный и короткий диаметр опухоли соответственно. Животных умерщвляли, когда их опухоли достигали 2 см<sup>3</sup>.

Анализ опухолей, собранных от мышей, с применением иммуноблоттинга и иммуноокрашивания. После 3-дневной обработки собирали опухоль из каждой группы и получали клеточные лизаты для иммуноблоттинга. Срезы опухолей, собранные от мышей, подвергали иммуногистохимическому окрашиванию для выявления пролиферации по Ki67 (BCR CRM325). Иммуногистохимические изображения получали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Zeiss по Ki67. Использовали линзы объектива Plan-Apochromat 63X/1,40 Oil DIC M27.

#### Клетки и культивирование клеток

Линии клеток ММ культивировали в среде RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки крови (GIBCO, 10437028), 2 мМ/л L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (GIBCO, 15140122). Их регулярно проверяли посредством проверки подлинности клеток человека с применением STR-профилирования в отношении их подлинности и контаминации микоплазмами. Образцы от пациентов с ММ и нормальных доноров получали после получения информированного согласия в соответствии с Хельсинкской декларацией и под эгидой протокола, одобренного Институциональным экспертным советом Института рака Дана-Фарбер. Первичные CD138+ плазматические клетки (чистота > 95%) очищали от мононуклеарных клеток костного мозга

(ВММС) из аспиринов ВМ от пациентов с ММ с применением микрошариков с антителами к CD138 (Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). Остаточные CD138-отрицательные ВММС дополнительно культивировали с получением ВМС. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из образцов РВ с применением градиента плотности среды фиколл-гипак. Бортезомиб приобретали у компании Selleckchem (Selleck Chemicals).

#### Анализ жизнеспособности и апоптоза клеток

Жизнеспособность клеток анализировали с применением ССК8 (Abcam, Кеймбридж, Массачусетс), CellTiter-Glo (CTG) (Promega) и измерения BLI. Апоптоз оценивали посредством проточного цитометрического анализа после окрашивания с помощью FITC-аннексина-V (BD Biosciences), PE-аннексина-V (BioLegend) и/или LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (Invitrogen, L34957) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки ММ метили с помощью CFSE (Invitrogen) и затем культивировали в течение 2 дней отдельно или с ВМС с последующим окрашиванием с помощью аннексина-V/Aqua и анализом посредством проточной цитометрии.

#### Анализ пролиферации с применением люциферазы

ВМС высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 часов для обеспечения адгезии клеток. Клетки MM1S1uc культивировали при соотношении 100:1 на конфлюэнтных слоях ВМС в среде RPMI в течение 4 дней. Пролиферацию измеряли посредством анализа с применением люциферазы в соответствии с протоколом производителя (Promega, Мэдисон, Висконсин).

#### Статистический анализ

Каждый эксперимент проводили по меньшей мере три раза и данные представляли в виде среднего значения  $\pm$  SD. Данные анализировали с применением t-критериев Стьюдента для сравнений 2 групп или 1-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) для множественных сравнений с применением программного обеспечения Graphpad (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния, США). Р-значение  $< 0,05$  считали статистически значимым. Взаимодействия лекарственных средств оценивали с помощью программного обеспечения CompuSyn с определением показателя аддитивности (CI).  $CI < 1$  указывал на синергизм, тогда как  $CI > 1$  – на антагонизм, а  $CI = 1$  – на аддитивный эффект.

### ПРИМЕР 1

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере, демонстрируют, что конъюгат антитела к ВСМА с PBD (M2) индуцирует более эффективную цитотоксичность в отношении устойчивых к лекарственному средству клеток ММ, чем его гомолог ADC на основе MMAF (M3).

Цитотоксичность ADC, состоящего из антитела к ВСМА, конъюгированного с PBD (M2), сравнивали с цитотоксичностью его гомолога ADC на основе MMAF (M3) в отношении панели

линий клеток ММ с различными уровнями экспрессии ВСМА и ответом на текущие лекарственные средства против ММ. Оба ADC состояли из одного и того же mAb к ВСМА (ВСМА-Ab1/15B2GL, как описано выше), но были конъюгированы с разными полезными нагрузками: PBD, сшивающий ДНК, в случае М2 (например теzirин), и связывающийся с микротрубочками MMAF в случае М3. С применением анализа 3-дневной жизнеспособности на основе ССК8 значения  $ED_{50}$  в случае М2 ниже, чем значения в случае М3 во всех тестируемых линиях клеток ММ ( $n = 10$ ), независимо от чувствительности к средствам терапии против ММ, включая дексаметазон и IMiD (ФИГ. 1А, ФИГ. 3А). В 8 линиях клеток ММ, не включая RPMI8226 (RPMI) и полученную из нее линию клеток RPMI-ВСМА, сверхэкспрессирующую ВСМА, значения  $ED_{50}$  находились в диапазоне от 11,85 до 3499 нг/мл и от 21,28 до 271431 нг/мл в случае М2 и М3 соответственно. Все клетки ММ несут различные мутации p53, за исключением клеток MM1S и H929, от которых получены две устойчивые к IMiD линии клеток MM1S(R) и H929(R) соответственно. М2, но не М3, является цитотоксичным для клеток RPMI8226, экспрессирующих наиболее низкие уровни ВСМА и характеризующихся устойчивостью к IMiD (ФИГ. 1А-В). С применением анализа синтеза ДНК М2 демонстрирует большую ( $> 1-2\text{-log}$ ) эффективность, чем М3, при блокировании пролиферации всех клеток ММ (ФИГ. 1В, ФИГ. 3В). Например, значения  $ED_{50}$  в случае М2 по сравнению с М3 составляют 189,7 относительно 21427 нг/мл в случае клеток RPMI8226. Кроме того, М2, но не М3, снижал жизнеспособность как клеток ANBL6, так и полученных из них устойчивых к бортезомибу (btz) клеток ANBL6-BR (ФИГ. 3С), культивируемых с IL-6. Эти парные IL-6-зависимые клетки ANBL6 являются нечувствительными к М3 и экспрессируют белок ВСМА клеточной мембраны на уровне, сопоставимом с таковым у клеток RPMI8226 (данные не показаны). Таким образом, клетки ММ с относительно более низкой экспрессией ВСМА также являются значительно более восприимчивыми к М2 по сравнению с М3.

С применением анализа посредством проточной цитометрии (FCM) после окрашивания аннексином V и Live/Dead Aqua было показано, что М2 индуцирует более ранний и повышенный апоптоз в парных линиях клеток ММ, чувствительных или устойчивых к дексаметазону (dex) или бортезомибу (btz), дозозависимым и времязависимым образом по сравнению с М3 (ФИГ. 1С, ФИГ. 3D). Эти результаты *in vitro* указывают на то, что М2 преодолевает устойчивость к современным лекарственным средствам против ММ (дексаметазону, леналидомиду, помалидомиду, бортезомибу) в большей степени, чем М3 в случае клеток ММ, независимо от уровней ВСМА и статуса p53.

## ПРИМЕР 2

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере, демонстрируют, что М2 является более эффективным, чем М3, при индукции цитотоксичности в отношении клеток ММ в микроокружении костного мозга и клеток ММ пациента.

Затем оценивали эффекты M2 и M3 в отношении клеток MM, совместно культивируемых со стромальными клетками костного мозга (BMSC) и IL-6, которые способствуют росту, выживанию и устойчивости к лекарственному средству клеток MM. С применением измерения BLI было показано, что BMSC значительно повышают скорость роста и выживаемость клеток MM1Sluc (ФИГ. 4А). В анализах на основе BLI и CTG M2 более эффективно, чем M3, подавляет жизнеспособность клеток MM1Sluc и всех остальных тестируемых линий клеток MM ( $n = 6$ ), совместно культивируемых с BMSC (ФИГ. 2А, ФИГ. 4А), с минимальным воздействием на ВСМА-отрицательные подгруппы клеток, отличных от MM, включая BMSC, PBMC и NK-клетки (ФИГ. 4В). С применением FCM-анализа для идентификации жизнеспособных клеток MM M2 более эффективно, чем M3, снижает выживаемость устойчивых к IMiD клеток MM1S(R) и H929(R), даже в присутствии BMSC (ФИГ. 2В). В количественных анализах на основе FCM (ФИГ. 2С) и CTG (ФИГ. 4С) M2 снижал рост и выживаемость клеток MM H929 в присутствии или в отсутствие IL-6.

После 3-дневной обработки доли живых и мертвых CD138+ клеток BM от пациентов с RRMM определяли количественно посредством FCM-анализа. Важно, что M2 дозозависимым образом повышал ( $>$  чем 2-кратно) количество апоптотических CD138+ клеток MM у пациента по сравнению с M3 (ФИГ. 4D). В анализах на основе CTG M2 также демонстрировал дозозависимую токсичность в отношении очищенных от CD138 клеток BM от 3 дополнительных пациентов с RRMM (ФИГ. 2Е), а также значительно истощает жизнеспособные CD38highCD138+ клетки BM от 4 пациентов с недавно диагностированной MM (NDMM). (ФИГ. 2F, слева, ФИГ. 4D) и 2 пациентов с RRMM (ФИГ. 2F, справа). Эти данные указывают на то, что M2 истощает клетки MM у пациента независимо от статуса заболевания и является значительно более цитотоксичным для клеток MM в микроокружении BM, чем M3.

### ПРИМЕР 3

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере, демонстрируют, что M2 в комбинации с бортезомибом индуцирует синергическую цитотоксичность в отношении клеток MM *in vitro* и *in vivo*.

Бортезомиб (btz) был выбран в качестве кандидата для совместной терапии с M2, поскольку btz является существующим средством терапии для лечения миеломы. По результатам FCM-анализа на основе аннексина V/PI M2 и btz в комбинации при низких дозах в течение 2 дней дополнительно усиливают апоптоз клеток JLN3 и RPMI8226 по сравнению с любым из этих средств отдельно (ФИГ. 5А-В,  $p < 0,01$ ). Значительное повышение гибели клеток после обработок лекарственными средствами в комбинации также наблюдается в случае устойчивых к btz клеток ANBL6-BR, культивируемых с IL-6 (что подтверждает наблюдение, что добавление btz обеспечивает эффект, превышающий аддитивный). Затем результаты анализов жизнеспособности на основе CTG анализировали с расчетом показателей аддитивности (CI). Значения  $CI < 1$  были получены в случае

более чем 6 репрезентативных линий клеток ММ, что указывает на синергические эффекты комбинации М2 плюс btz (ФИГ. 5С, ФИГ. 6).

Затем *in vivo* эффективность субоптимальных доз М2 с btz оценивали на мышинной модели ксенотрансплантата ММ1S. Мышей с пальпируемыми опухолями ММ1S рандомизировали на 4 группы, получающие либо среду-носитель в качестве контроля, либо однократную обработку М2, либо 6 обработок с помощью btz (0,4 мг/кг) отдельно или с М2. Через 24 дня после обработки однократная доза М2 или суммарно 6 доз btz значительно задерживают рост опухоли ММ1S у мышей по сравнению со средой-носителем в качестве контроля (ФИГ. 7А,  $p < 0,005$ ). Обработка комбинацией значительно уменьшала объем опухоли по сравнению с любым одним средством отдельно ( $p < 0,04$ ). Обработка с помощью М2 плюс btz хорошо переносилась, так как она не оказывала влияния на вес тела всех животных (ФИГ. 7В). Последующее наблюдение в течение 177 дней демонстрирует значительное повышение медианной общей выживаемости в группе, обработанной комбинацией, по сравнению с когортами, обработанными любым средством отдельно (cnt, 22 дня; М2, 40,5 дня; btz, 35 дней; М2+btz, 57 дней) ( $p < 0,045$ ) (ФИГ. 7С). На 177-й день 15% мышей все еще живы без какого-либо роста опухоли в группе, обработанной комбинацией.

Иммуногистохимический анализ (ИНС) в отношении Ki67 (клеточного маркера пролиферации) дополнительно подтверждает более эффективное подавление пролиферации после обработки комбинацией по сравнению с обработкой одним средством (ФИГ. 7D), при этом следует обратить внимание на снижение количества окрашенных клеток (темный цвет) при обработке с помощью М2+btz.

Способы комбинированной обработки с помощью М2 и btz значительно снижали скорость роста ксенотрансплантатов ММ1S *in vivo* (ФИГ. 8), демонстрируя синергизм *in vivo* М2 и btz в лечении миеломы.

В заключение следует отметить, что по синергической активности М2 с btz, наблюдаемой *in vitro* на клеточном уровне, можно судить о превосходной эффективности *in vivo* в плазмоцитомной модели ММ.

### ОБСУЖДЕНИЕ ПРИМЕРОВ 1-3

Рецидив заболевания вследствие устойчивости к лекарственному средству остается основным препятствием для более длительного выживания при ММ. Следовательно, требуются новые средства терапии для преодоления устойчивости к лекарственному средству и удовлетворения неудовлетворенной медицинской потребности при RRMM. В данном документе авторы настоящего изобретения сначала демонстрируют, что ADC (М2; антитело к ВСМА, конъюгированное с PBD) обладает более высокой цитотоксичностью в отношении всех тестируемых линий клеток ММ и

клеток ММ пациента, чем его гомолог ADC на основе MMAF. Димеры PBD вызывают клеточную гибель как быстро делящихся, так и менее активных клеток, в отличие от MMAF, который преимущественно нацеливается на пролиферативные опухолевые клетки посредством связывания с тубулином. M2 вызывает более сильный эффект в отношении пролиферации клеток ММ, чем его гомолог ADC на основе MMAF, в том числе клеток с низкими уровнями экспрессии BCMA и устойчивостью к современным средствам терапии, даже в присутствии BMSC и IL-6. Эти данные свидетельствуют о том, что M2 может быть более эффективным в лечении агрессивной ММ, чем его гомолог ADC на основе MMAF.

Важно, что обработка комбинацией M2 и btz *in vitro* индуцирует синергическую гибель всех тестируемых клеток ММ, о чем свидетельствовало значение  $CI < 1$ . Следует отметить, что M2 проявляет синергию с btz даже в случае устойчивых к btz клеток ANBL6-BR, что указывает на то, что за повышение цитотоксичности также отвечают другие неопределенные молекулы.

У мышей, несущих опухоли MM1S, M2 значительно более эффективен, чем btz, в качестве отдельного средства терапии. Важно, что подавление роста опухоли *in vivo* дополнительно усиливалось при комбинировании M2 с btz. Значительный некроз опухоли наблюдается раньше у мышей, получающих оба лекарственных средства, чем у мышей, получающих средство отдельно, и на 177-й день 15% мышей в группе обработки комбинацией остаются живыми и без опухоли. Важно, что отсутствие потери веса наблюдается во всех группах, что указывает на благоприятный профиль безопасности M2 *in vivo*, что свидетельствует о том, что обработка комбинацией M2 и btz может быть безопасно использована *in vivo*.

Таким образом, M2 специфически запускает эффективное подавление роста и гибель даже в случае клеток ММ, устойчивых к современным средствам терапии для лечения ММ и защищенных микроокружением ВМ. *In vivo* M2 является более эффективным, чем btz, и комбинирование M2 с btz дополнительно повышает эффективность и продлевает выживаемость хозяина.

#### ПРИМЕР 4

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере, демонстрируют, что M2 значительно активирует ответ на повреждение ДНК и сигнальные каскады репарации с последующим апоптозом у чувствительных к лекарственным средствам и устойчивых к лекарственным средствам клеток ММ.

Анализ посредством иммуноблоттинга использовали для определения индукции сигнальных каскадов ответа на повреждение ДНК (DDR), запускаемых M2 в линиях клеток ММ времязависимым и дозозависимым образом. M2, но не M3, индуцирует фосфорилирование ATM, киназы 1 контрольной точки клеточного цикла (CHK1) и CHK2 (CHK1/2), а также гистона 2AX

(H2AX), раннее событие в ответе на двухцепочечный разрыв ДНК (DSB) (фиг. 9А и 10А). M2-стимулируемое фосфорилирование ATM и CHK1/2 выявляется через 4 ч и сохраняется в течение > 1 дня после обработки. Более раннюю и более выраженную активацию ATM и CHK1/2, запускаемую посредством M2, наблюдали в случае клеток H929, которые экспрессируют значительно более высокие уровни BCMA, чем клетки MM1S (фиг. 10А, С). Интенсивность M2-индуцируемого фосфорилирования ATM и CHK1/2 также коррелировала с уровнями BCMA, полученными от исходных клеток MM RPMI8226 (фиг. 10D). M2-индуцируемое фосфорилирование ATM и CHK1/2 происходит в значительно большей степени, чем фосфорилирование ATR, у тестируемых клеток MM. После 2-дневной обработки с помощью M2 расщепление PARP (сPARP) и каспазы 3 (сCas3) индуцируется BCMA-зависимым образом (фиг. 10В, E-F), что связано с повышенным уровнем фосфорилированного H2AX ( $\gamma$ H2AX) (фиг. 10В), что указывает на то, что M2 индуцирует повреждения ДНК с последующим апоптозом клеток MM. Важно, что M2 дозозависимо индуцирует фосфорилирование ATM и CHK1/2 во всех линиях клеток MM, включая 6 линий клеток с мутациями p53 (фиг. 9b-c). В тех же условиях обработки, что и в случае M2, M3 не индуцирует ни ATM/ATR, ни CHK1/2 (фиг. 10А). M2 является более эффективным, чем M3, в индукции сPARP и сCas3 (фиг. 10F), что согласуется с его более высокой эффективностью, чем у M3, в запуске апоптоза клеток MM. Существенно, что M2 запускал сигнальные пути ATM/ATR и нижележащих CHK1/2, расщепление  $\gamma$ H2AX и PARP в клетках ANBL6 и парных устойчивых к btz клетках ANBL6-BR (фиг. 9c). Выраженная активация ATM и CHK1/2 с помощью M2 также наблюдается в устойчивых к IMiD клетках H929(R) в той же степени, что и в исходных клетках MM H929 (фиг. 9d). Таким образом, в устойчивых к btz и len клетках MM M2 все еще индуцирует BCMA-зависимые сигнальные пути DDR посредством активации сигнального каскада ATR/ATM-CHK1/2 с последующим апоптозом.

Анализ механизма репарации ДНК с применением микрочипа TagMan® демонстрирует, что M2 изменяет экспрессию генов, ассоциированных с репарацией повреждений ДНК (51 из 72), в клетках MM H929 (фиг. 11a). В различных чувствительных к лекарственным средствам и устойчивых к лекарственным средствам клетках MM ( $n > 6$ ) M2 дозозависимым образом индуцирует RAD51, который связывается с ICL в ДНК до образования DSB (фиг. 11b-c), тогда как M3 этого не делает (фиг. 10G). Таким образом, в клетках MM M2 специфически активирует ATM/ATR-CHK1/2-опосредованные сигнальные каскады DDR и индуцирует нижележащие молекулы, связанные с DDR, с повышением уровня  $\gamma$ H2AX и RAD51 с последующим апоптозом.

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в данный документ посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и системы по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от объема и сущности настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявляемое изобретение не

следует чрезмерно ограничивать такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных способов осуществления настоящего изобретения, которые очевидны для специалистов в области биохимии и биотехнологии или в смежных областях, входят в объем приведенной ниже формулы изобретения.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Идентификатор	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 тяжелой цепи (HCDR1)	SYSMN	1
HCDR2	SISGSSNYIYYADSVKG	2
HCDR3	GGNYVVEYFQY	3
CDR1 легкой цепи (LCDR1)	RASQYISSNYLA	4
LCDR2	GASNRAT	5
LCDR3	QQYGSSPIT	6
VH (зародышевого типа)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQYWGQ GLTVTVSS	7
VL (зародышевого типа)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASNRAITGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	8
VH (WT)	EIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCARGGNYYVEYFQYWGQ GLTVTVSS	9
VL (WT)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASNRAITGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	10
Константная область тяжелой цепи: (вставка цистеина выделена):	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11
Человеческая легкая каппа-цепь	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	12
Последовательность ВСМА человека; UniProtKB – Q02223	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQ RYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLL RKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPR GLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDFCFPLPAMEEGATIL VTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR	13

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственный препарат для лечения В-клеточного злокачественного новообразования, содержащий:
  - a. конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
  - b. ингибитор протеасомы;где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ингибитора протеасомы, или  
где лекарственный препарат обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичным в остальном лекарственным препаратом, но без указанного ADC.
2. Терапевтическая комбинация для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, при этом указанная терапевтическая комбинация содержит:
  - a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BCMA, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
  - b. ингибитор протеасомы;где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или  
где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.
3. Способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования, при этом способ включает введение субъекту терапевтической комбинации, содержащей:
  - a. ADC, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BCMA, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, и
  - b. ингибитор протеасомы;где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ингибитора протеасомы, или

где терапевтическая комбинация обеспечивает повышенную супрессию В-клеточного злокачественного новообразования по сравнению с идентичной в остальном композицией, но без указанного ADC.

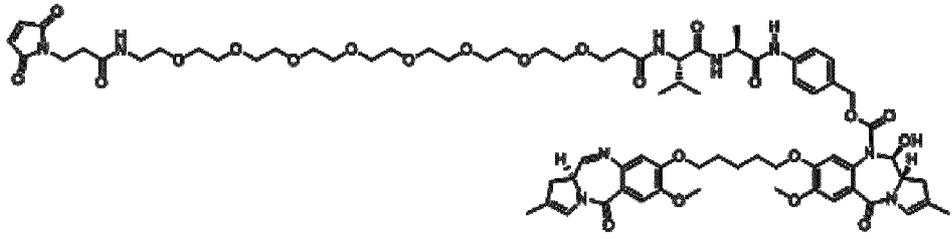
4. *In vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ADC, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (а) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты, в комбинации с (b) ингибитором протеасомы.
5. *In vitro* способ усиления супрессии злокачественной В-клетки с помощью ингибитора протеасомы, при этом указанный способ включает приведение злокачественной В-клетки в контакт с (а) ингибитором протеасомы в комбинации с (b) ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ВСМА, конъюгированные со средством, сшивающим нуклеиновые кислоты.
6. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или *in vitro* способ по любому из предыдущих пунктов:
  - а. где указанный ингибитор протеасомы вводят до, одновременно или последовательно с указанным ADC, или
  - б. где указанный ADC вводят до, одновременно или последовательно с указанным ингибитором протеасомы.
7. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или *in vitro* способ по любому из предыдущих пунктов, где указанное В-клеточное злокачественное новообразование характеризуется наличием злокачественной В-клетки, характеризующейся повышенным уровнем экспрессии антигена ВСМА по сравнению с эталонной незлокачественной В-клеткой.
8. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанное В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой одно или несколько новообразований, выбранных из В-клеточной лимфомы, В-клеточного лейкоза, миеломы, множественной миеломы или их комбинации.
9. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанное В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

10. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат следующие шесть CDR:
- CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант;
  - CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или ее функциональный вариант;
  - CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, или ее функциональный вариант;
  - CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант;
  - CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, и
  - CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант.
11. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID: NO 7, или ее функциональный эквивалент, и/или
  - вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID: NO 8, или ее функциональный эквивалент.
12. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую вставку цистеина (C) между серином (S) в положении 239 и валином (V) в положении 240, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat.
13. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.
14. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий

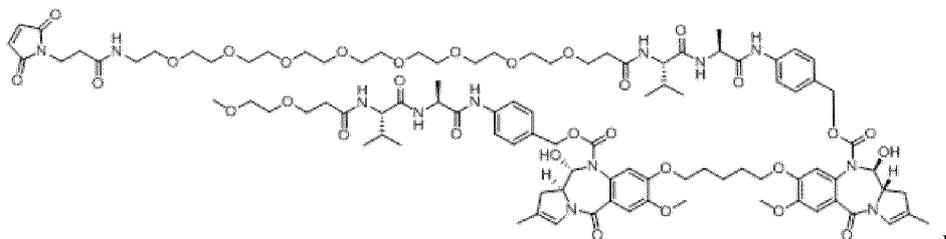
фрагмент содержат константную область человеческой каппа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

15. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор протеасомы представляет собой один или несколько ингибиторов, выбранных из бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, маризомиба, опрозомеиба, деланзомиба или их комбинации.
16. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор протеасомы представляет собой бортезомиб.
17. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанное средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой пирролобензодиазепин (PBD).
18. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанное средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой PBD из одного или нескольких PBD, выбранных из (a) SG3249, (b) SG3315 или (c) SG3400, имеющих формулу:

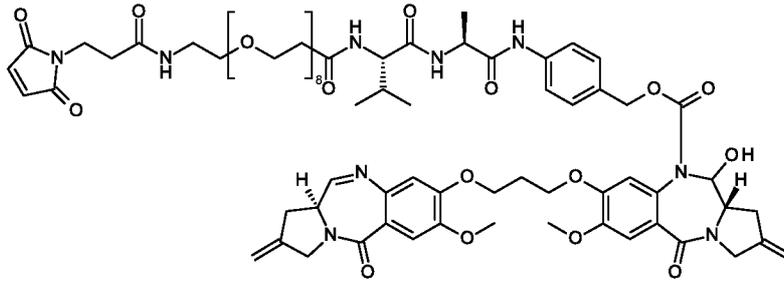
(a)



(b)



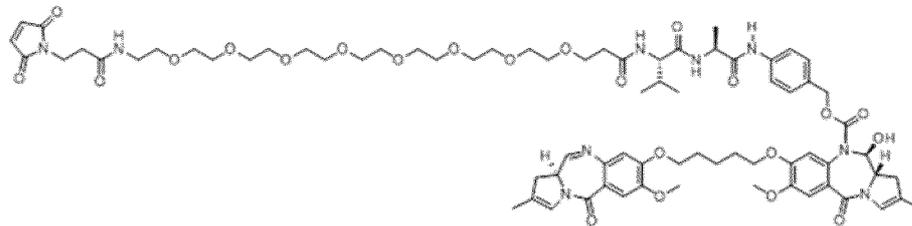
(c)



соответственно,

или их комбинации.

19. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанное средство, сшивающее нуклеиновые кислоты, представляет собой PBD SG3249, имеющий формулу:



20. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.
21. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где лекарственный препарат или терапевтическая комбинация содержат фармацевтически приемлемый носитель.
22. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к одному или нескольким лекарственным средствам, выбранным из дексаметазона, леналидомида, помалидомида, бортезомиба или их комбинации.
23. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где В-клеточное злокачественное новообразование является устойчивым к бортезомибу.
24. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанная повышенная супрессия В-клеточного злокачественного новообразования предусматривает одно или несколько проявлений супрессии, выбранных из повышенного замедления роста опухоли, повышенного

уменьшения размера опухоли, повышенного снижения метастазирования опухоли, повышенного показателя выживаемости субъекта, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, или их комбинации.

25. Лекарственный препарат, терапевтическая комбинация для применения, способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где лекарственный препарат или терапевтическую комбинацию вводят путем внутривенной инфузии.

ФИГ. 1

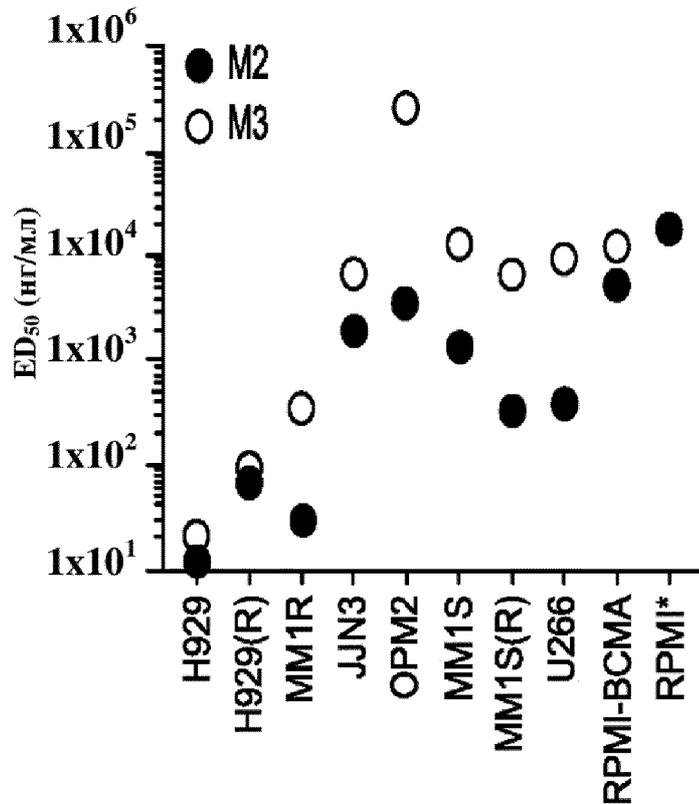
А

Экспрессия ВСМА

3-дневный анализ с ССК8		H929	H929(R)	MM1R	JJN3	OPM2	MM1S	MM1S(R)	U266	RPMI-BCMA	RPMI*
ED <sub>50</sub> (нг/мл)	M2	11,85	68,95	29,83	1833	3499	1362	333,5	412	5410	19311
	M3	21,28	104,8	341,3	6823	3E+05	13232	6632	9969	12323	н. д.
Соотношение ED <sub>50</sub>	M2/M3	0,56	0,66	0,09	0,27	0,01	0,10	0,05	0,04	0,44	н. д.

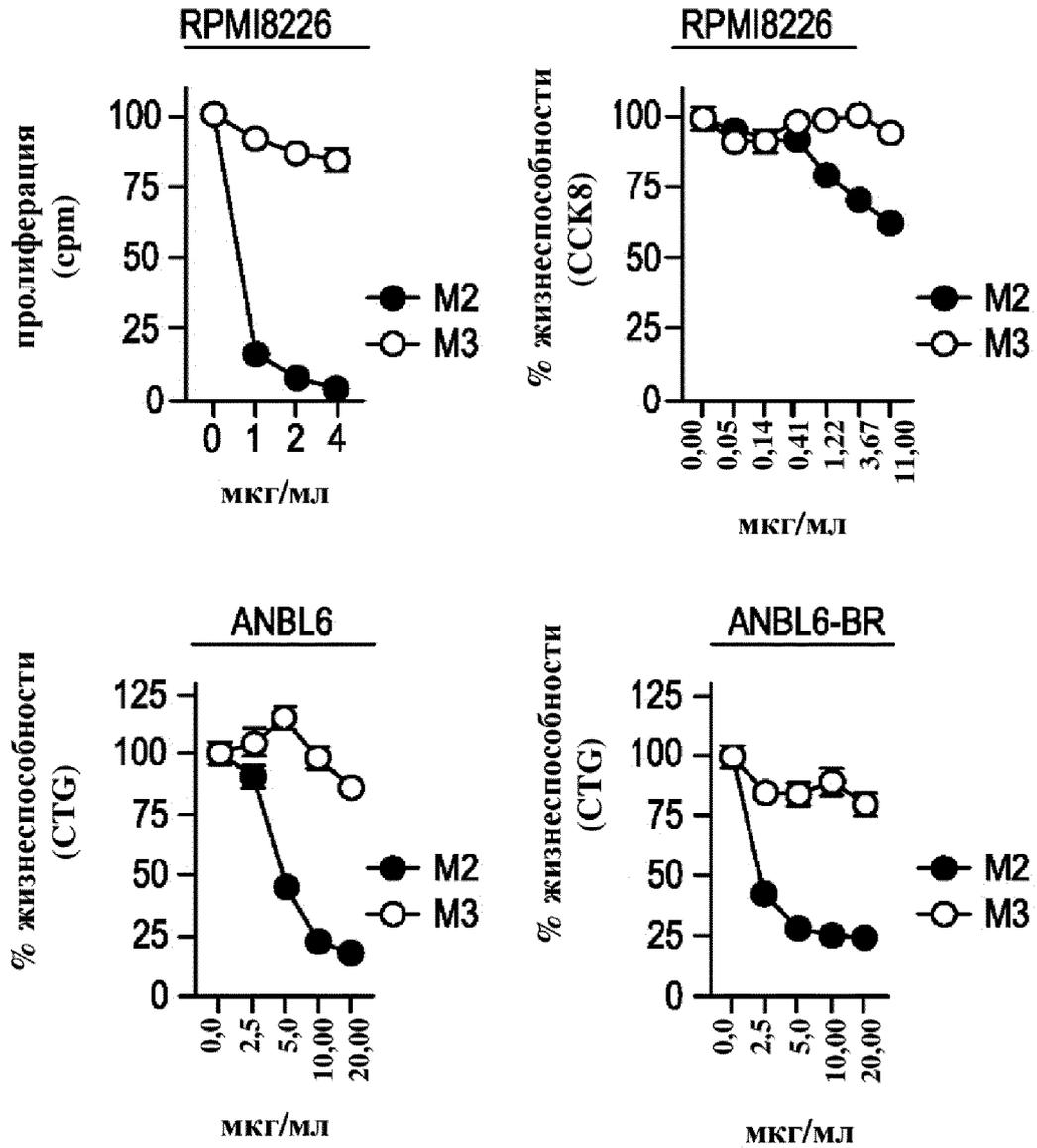
\*нечувствительный к М3

н. д., недоступно

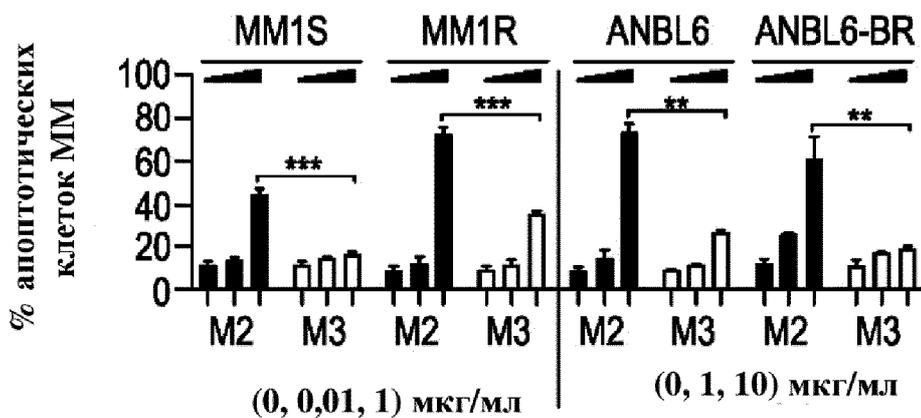


ФИГ. 1 (продолжение)

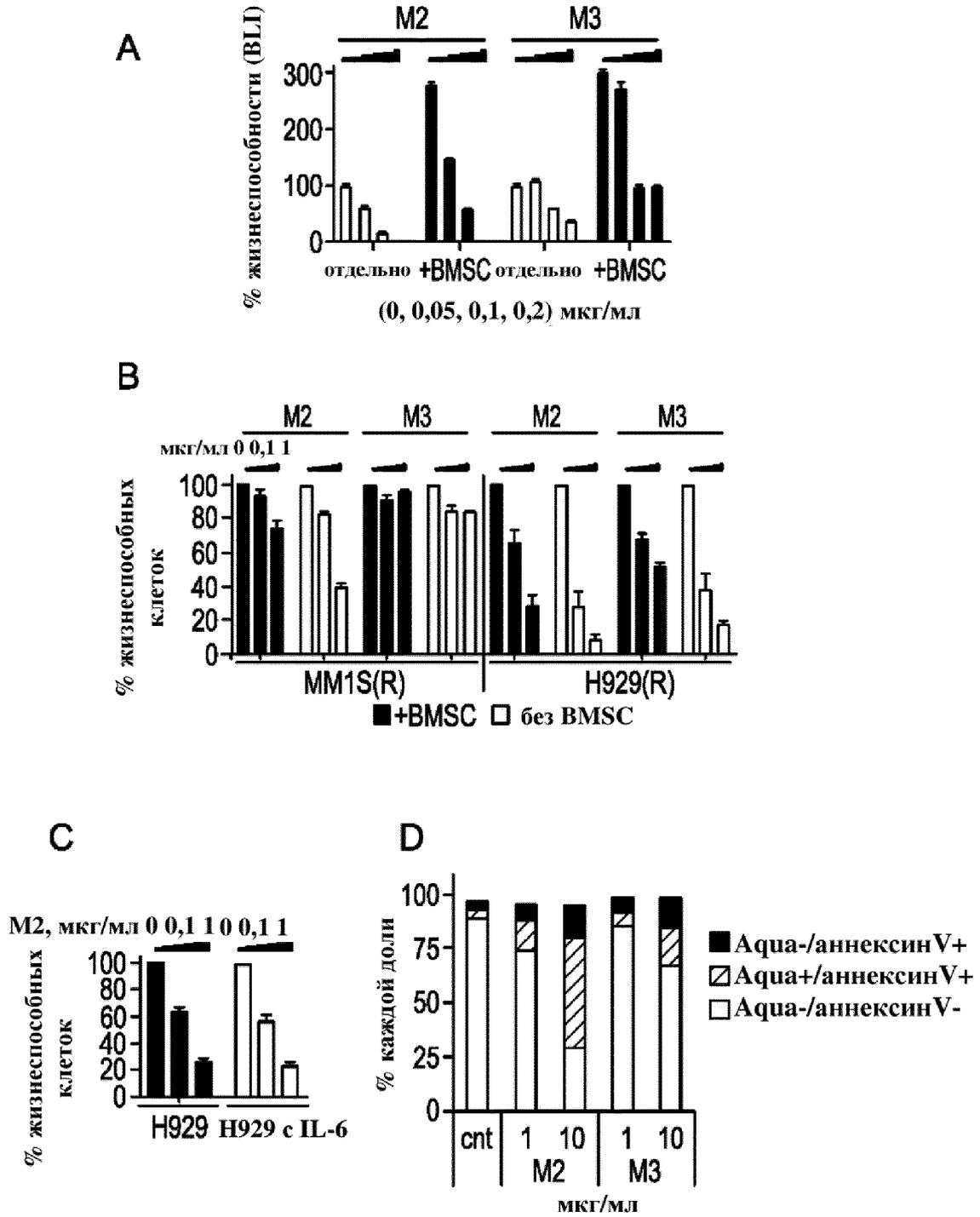
В



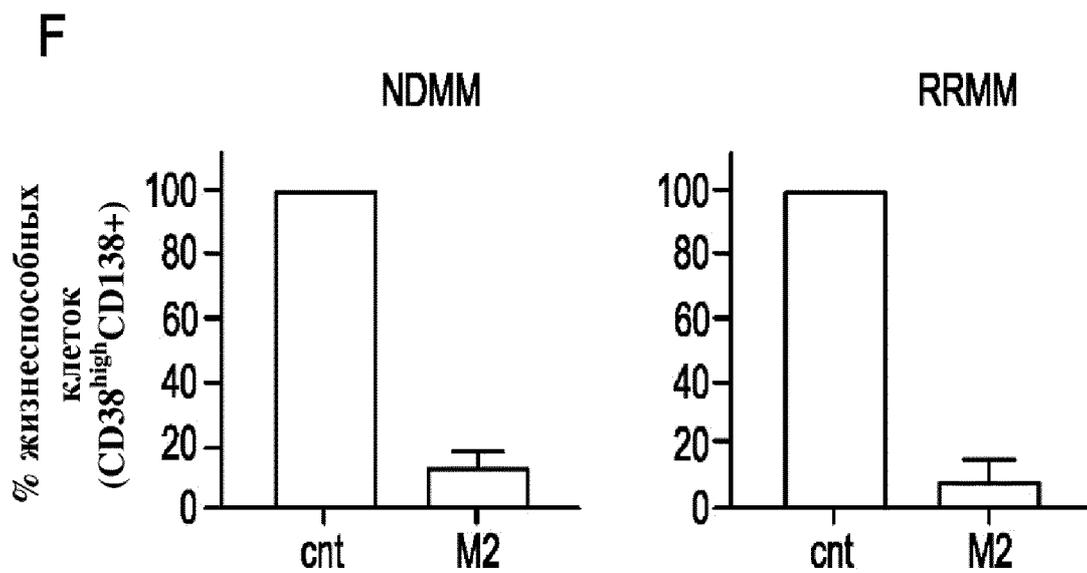
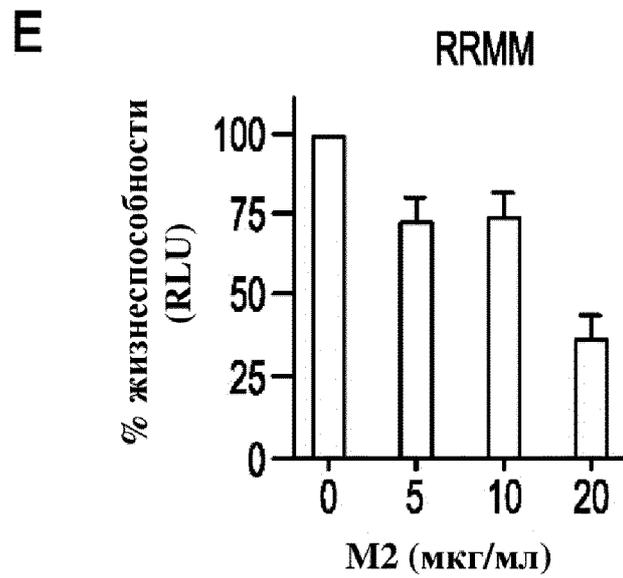
С



ФИГ. 2

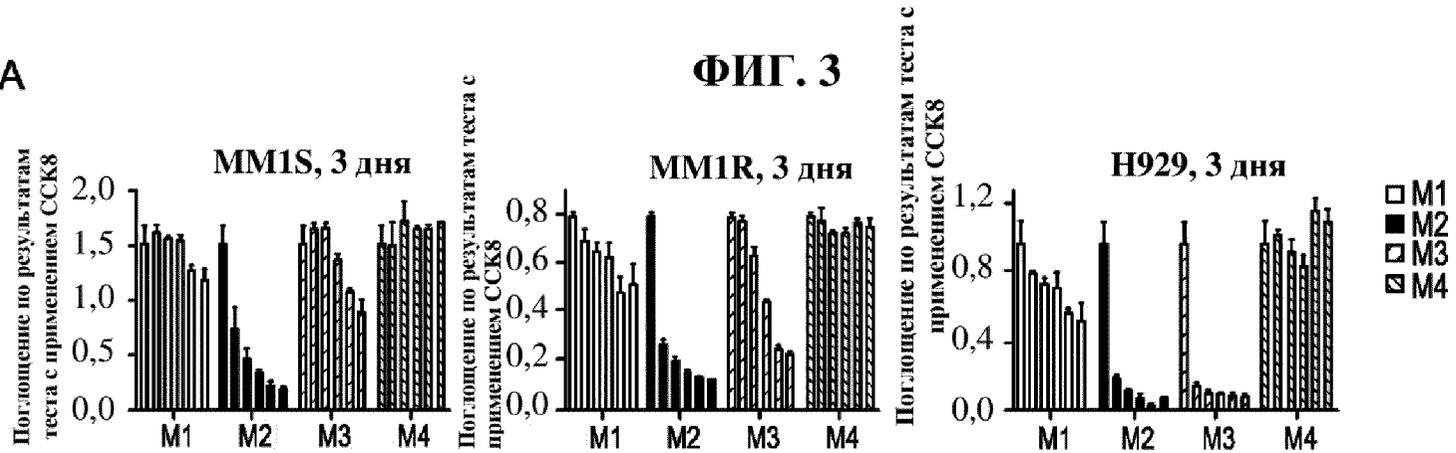


**ФИГ. 2**  
**(продолжение)**



**A**

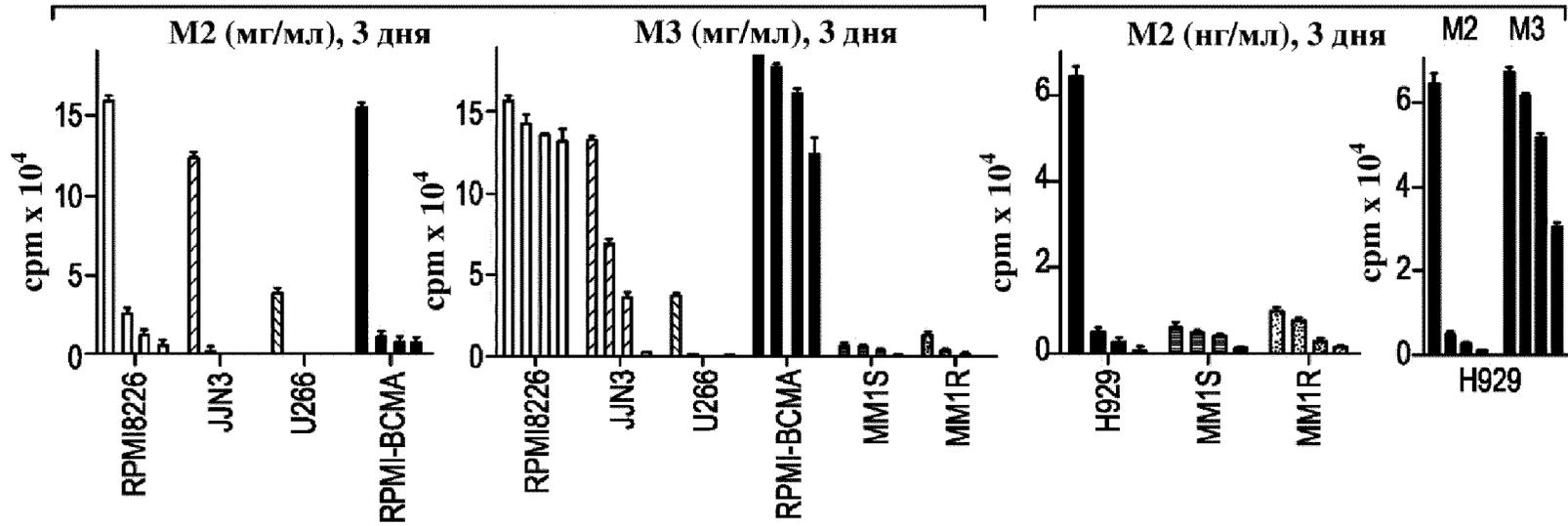
**ФИГ. 3**



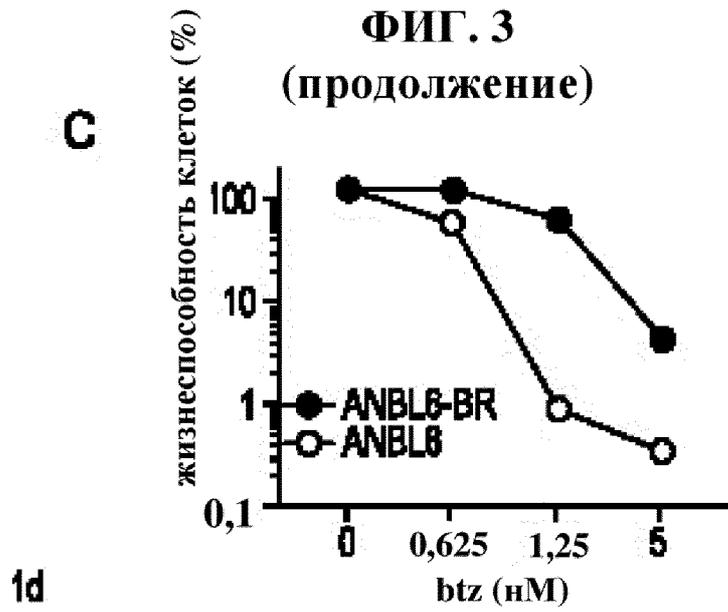
значения концентрации лекарственного средства: 0, 45,2, 136, 410, 1220, 3670 нг/мл

**B**

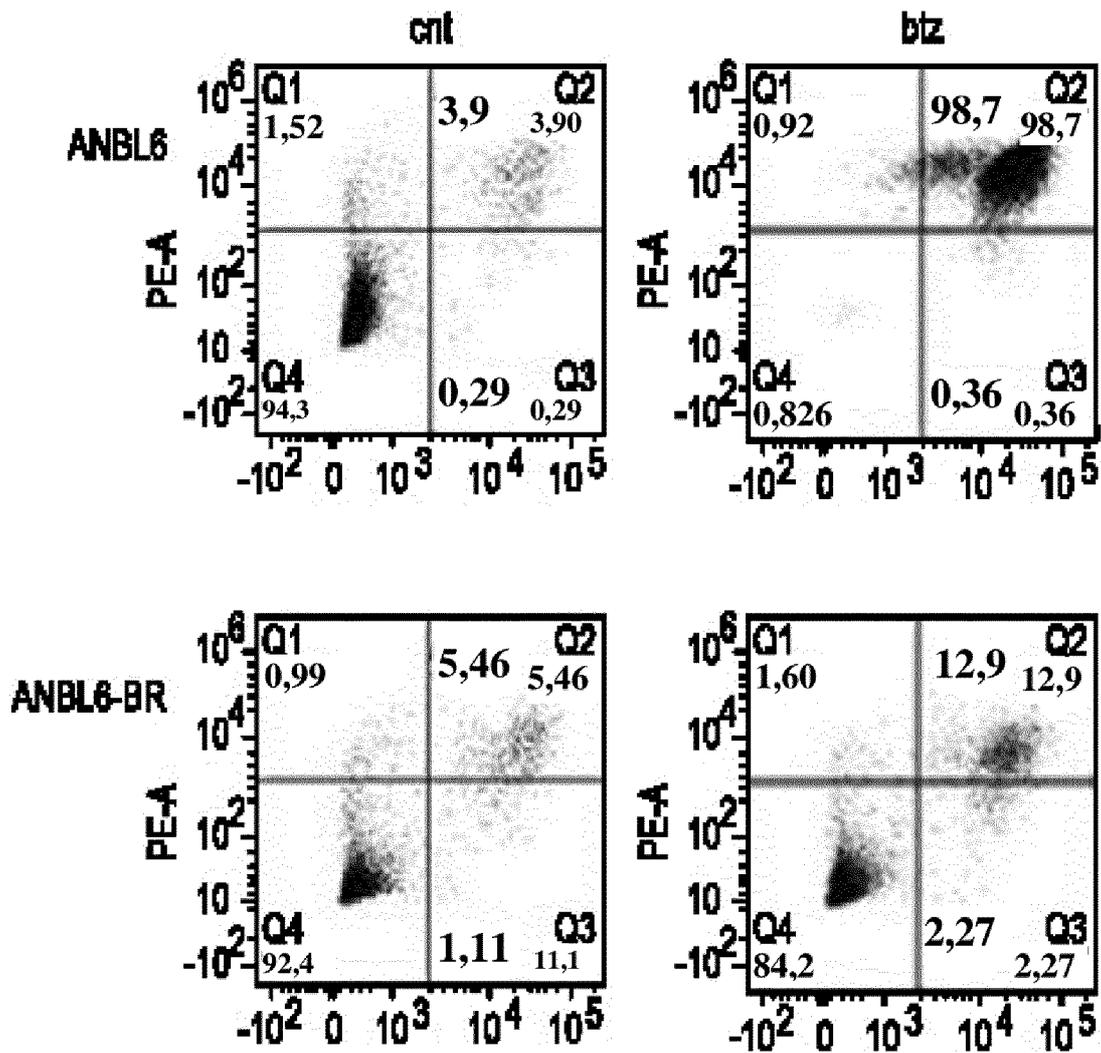
значения концентрации лекарственного средства: 0, 1, 2, 4 мкг/мл      значения концентрации лекарственного средства: 0, 5, 10, 20 нг/мл



**ФИГ. 3**  
(продолжение)

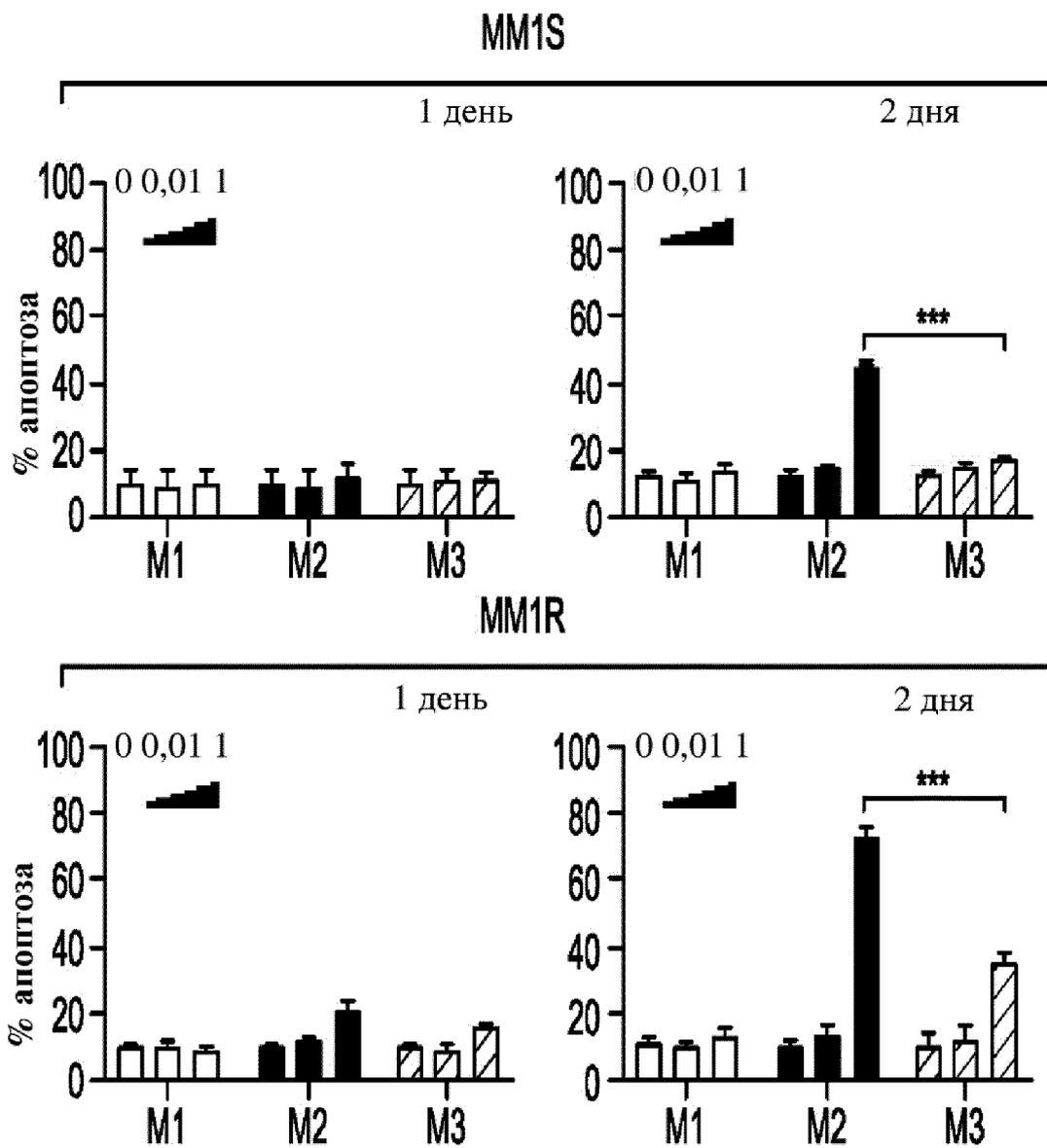


1d

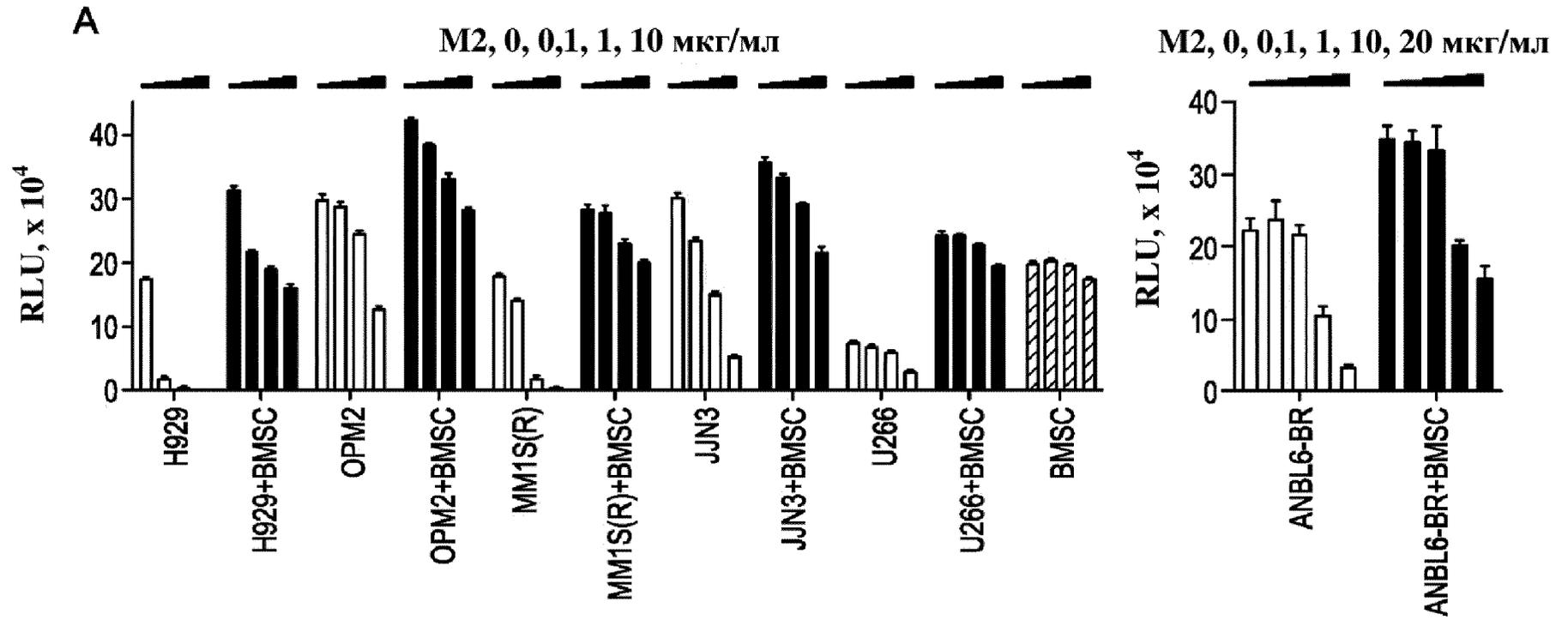


**ФИГ. 3**  
(продолжение)

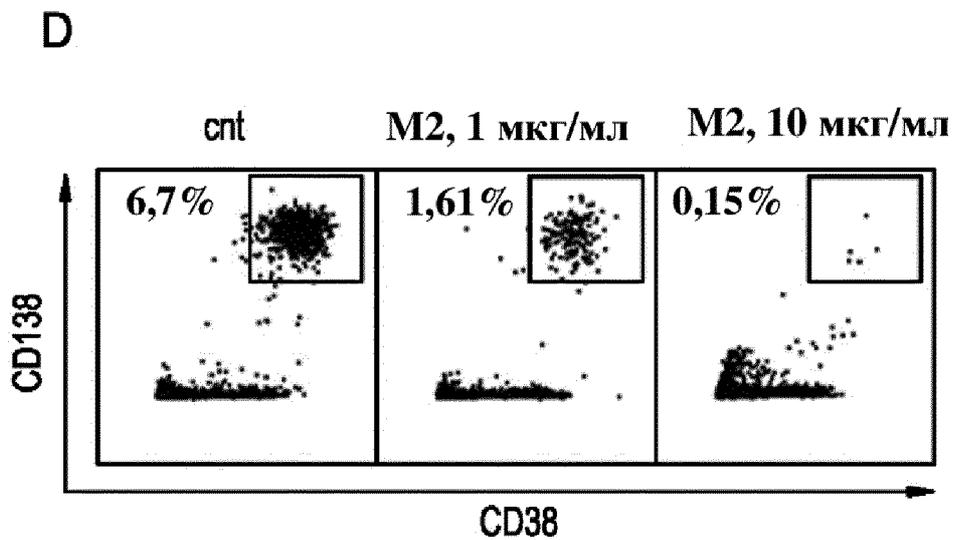
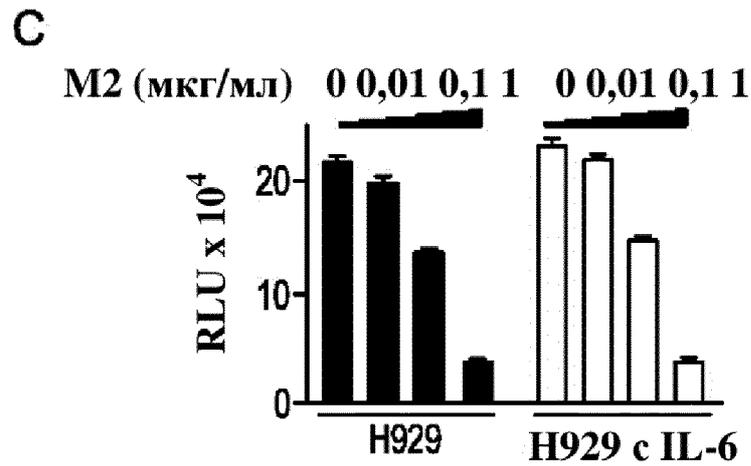
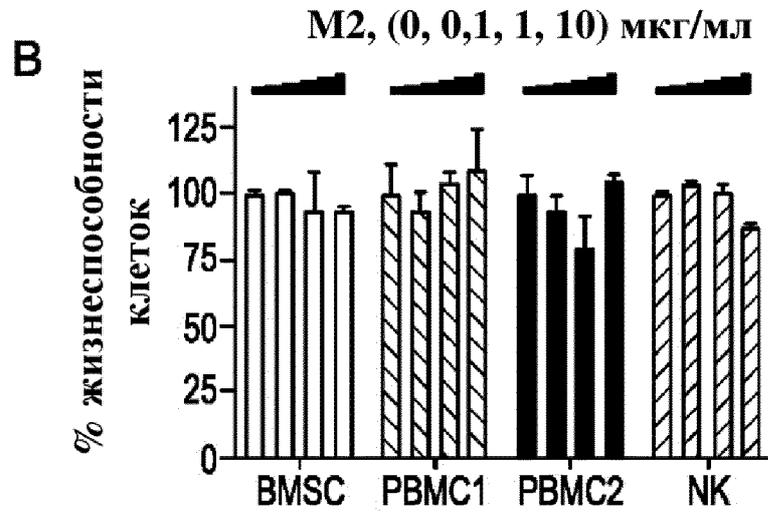
**D**



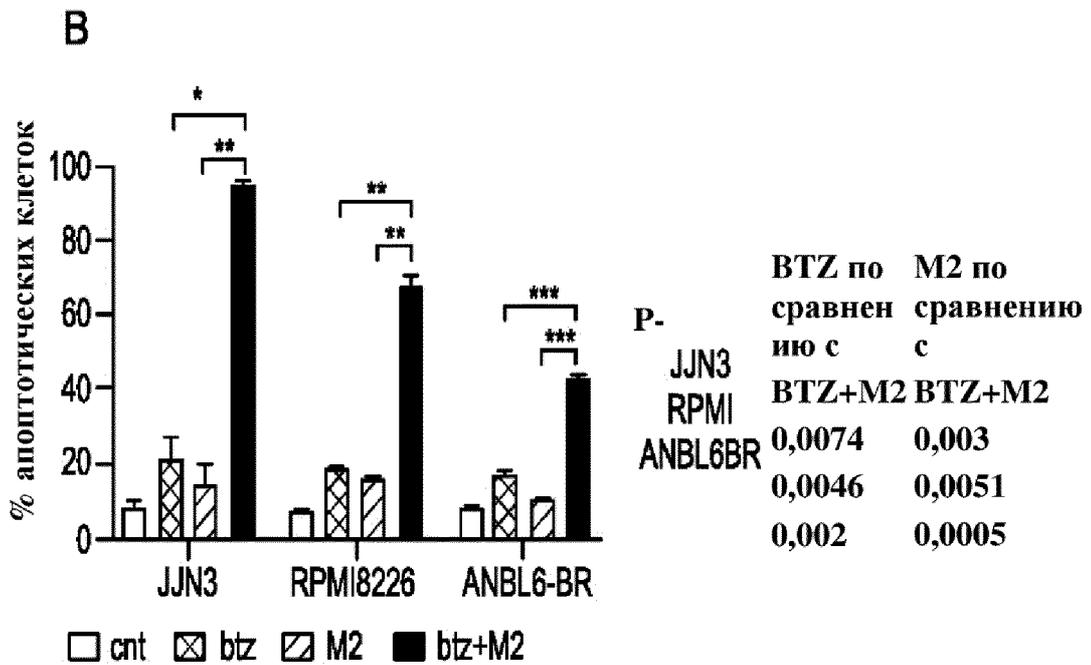
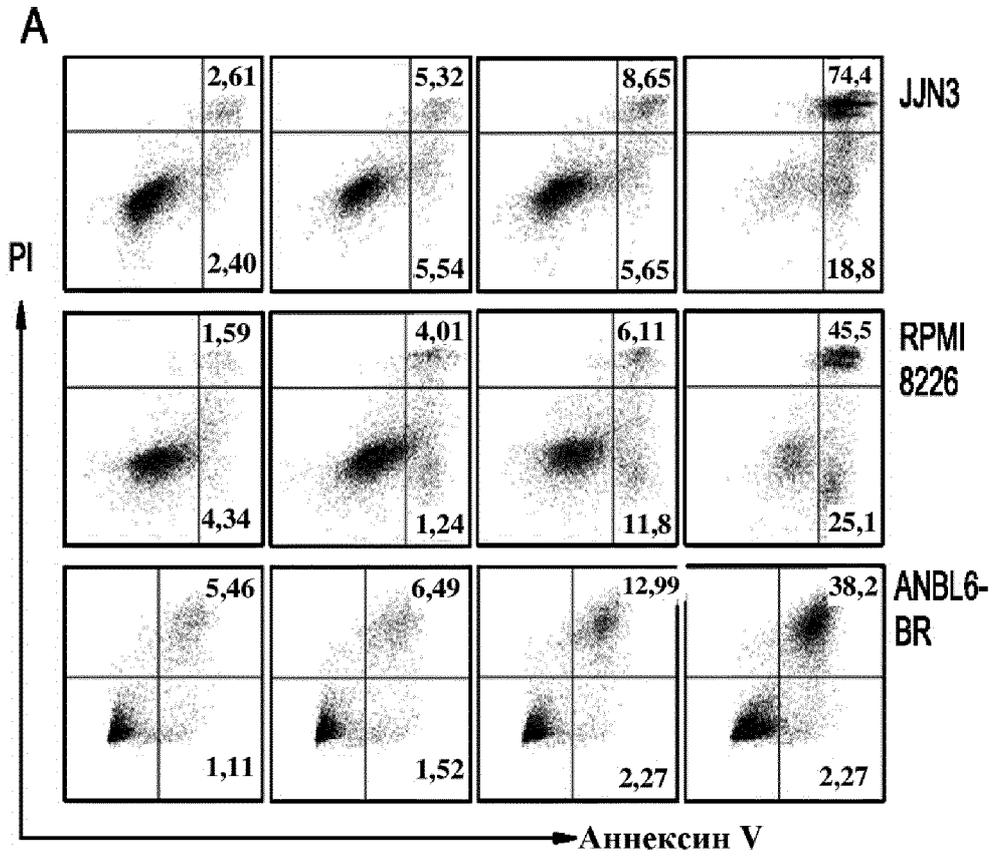
ФИГ. 4



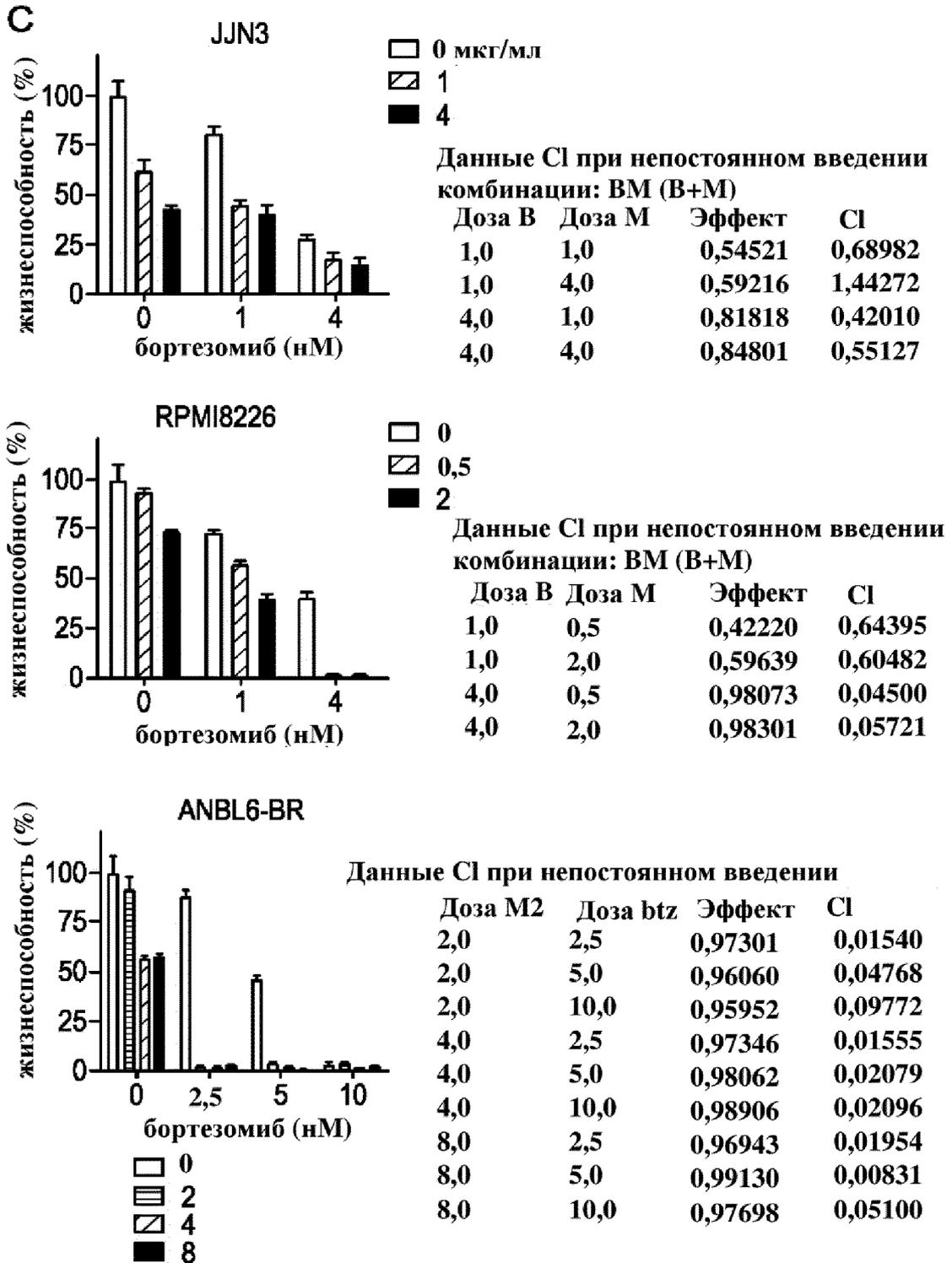
## ФИГ. 4 (продолжение)



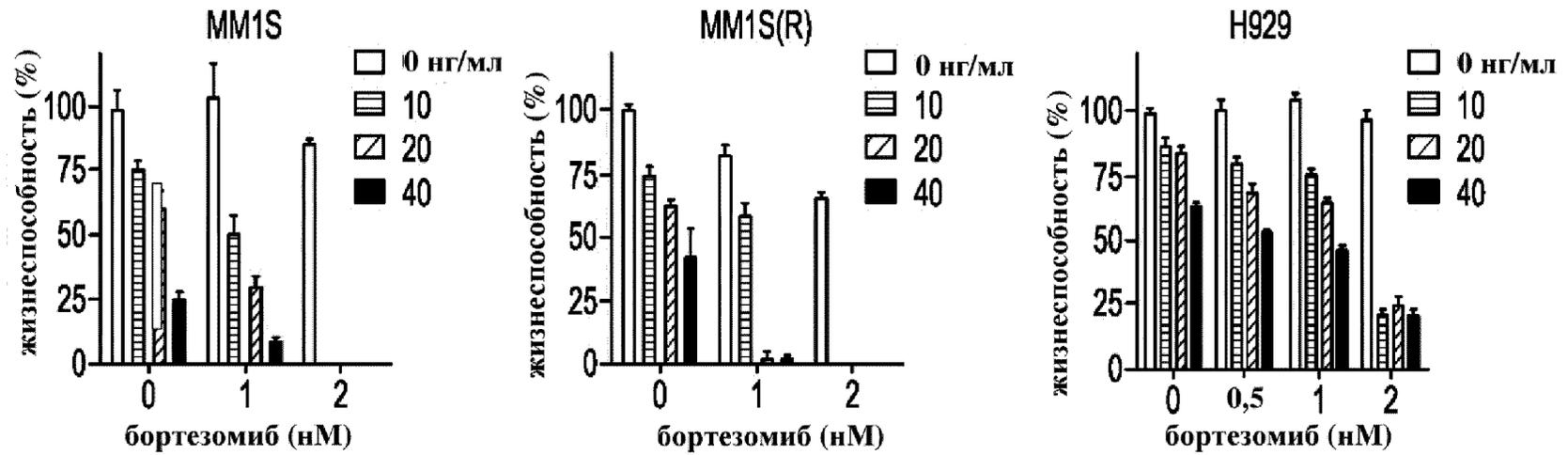
ФИГ. 5



ФИГ. 5 (продолжение)



ФИГ. 6



Данные CI при непостоянном введении комбинации: B2 (bor+M2)

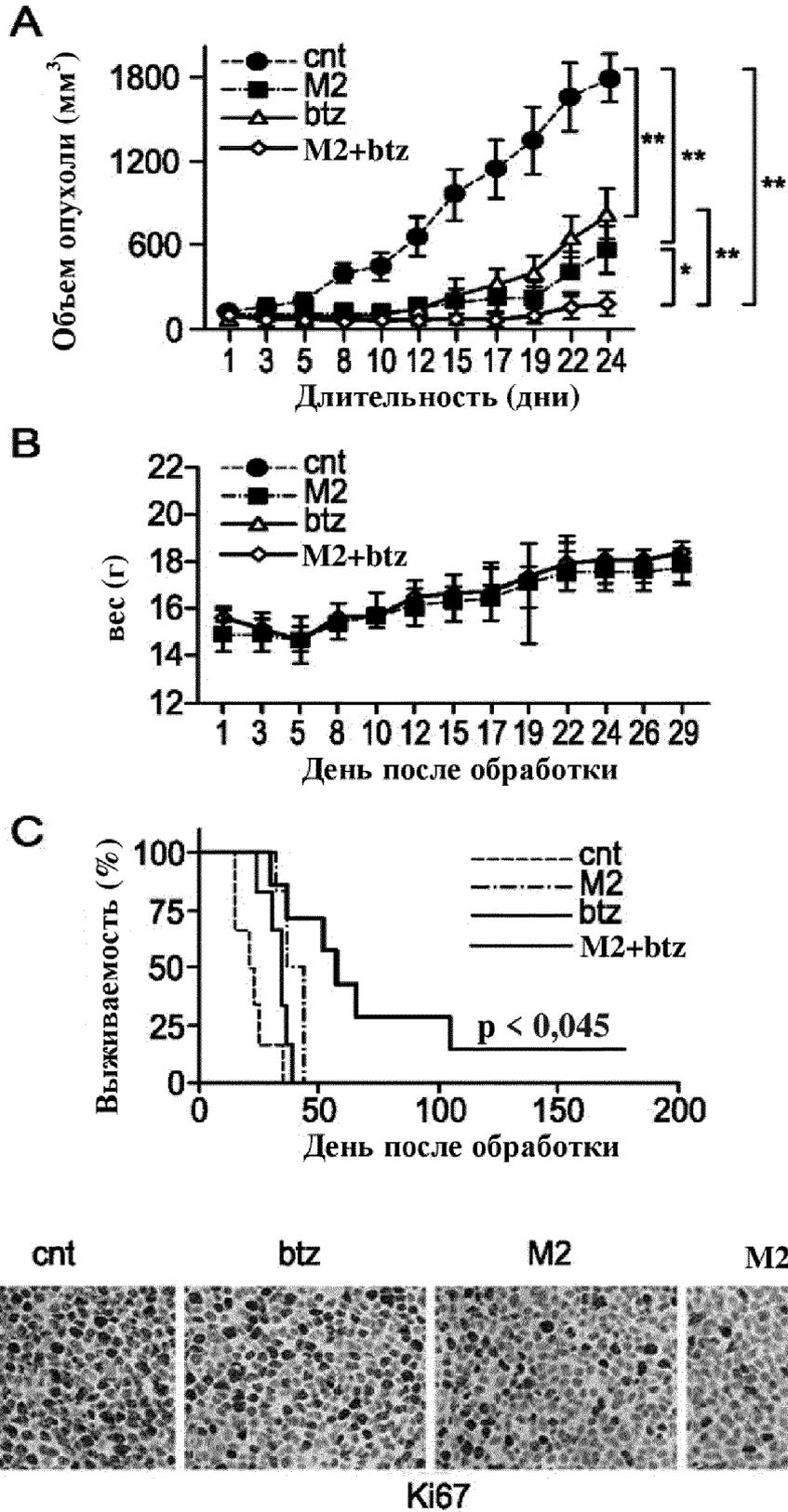
Доза bor	Доза M2	Эффект	CI
1,0	10,0	0,49	0,88145
1,0	20,0	0,39	1,61009
1,0	40,0	0,91	0,78495
2,0	10,0	0,999	0,44856
2,0	20,0	0,999	0,45561
2,0	40,0	0,9999	0,36284

Данные CI при непостоянном введении комбинации: Btz+M2 (BTZ+M2)

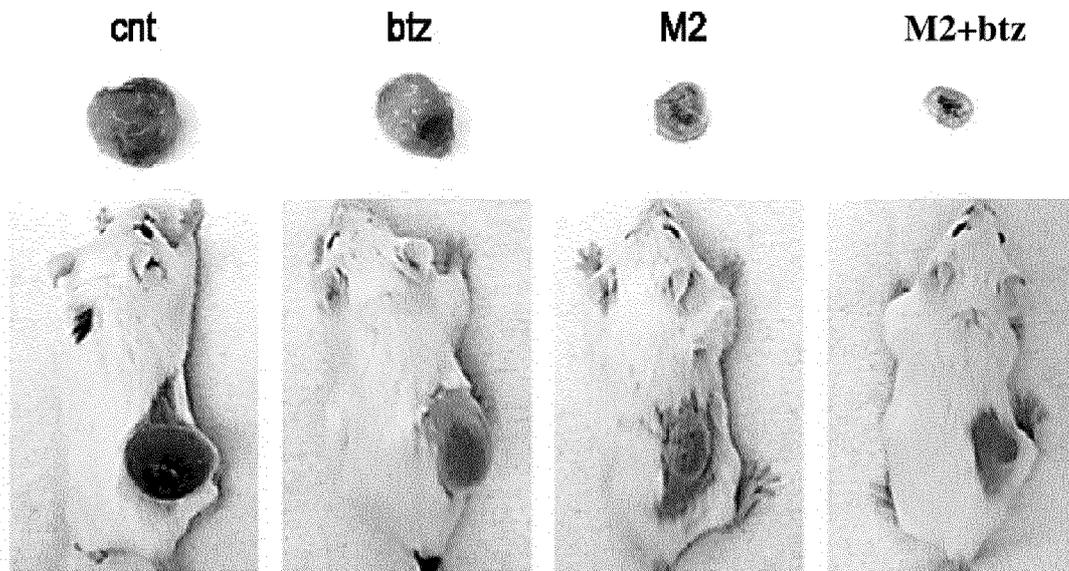
Доза BTZ	Доза M2	Эффект	CI
1,0	10,0	0,41209	0,77235
1,0	20,0	0,96725	0,02312
1,0	40,0	0,96977	0,03737
2,0	10,0	0,99998	6,92E-6
2,0	20,0	1,00000	4,27E-7
2,0	40,0	1,00000	4,7E-10

Доза bor	Доза M2	Эффект	CI
0,5	10,0	0,21	0,63984
0,5	20,0	0,3	0,76866
0,5	40,0	0,48	0,73767
1,0	10,0	0,24	0,69373
1,0	20,0	0,35	0,75790
1,0	40,0	0,54	0,70532
2,0	10,0	0,8	0,34391
2,0	20,0	0,8	0,38454
2,0	40,0	0,8	0,46580

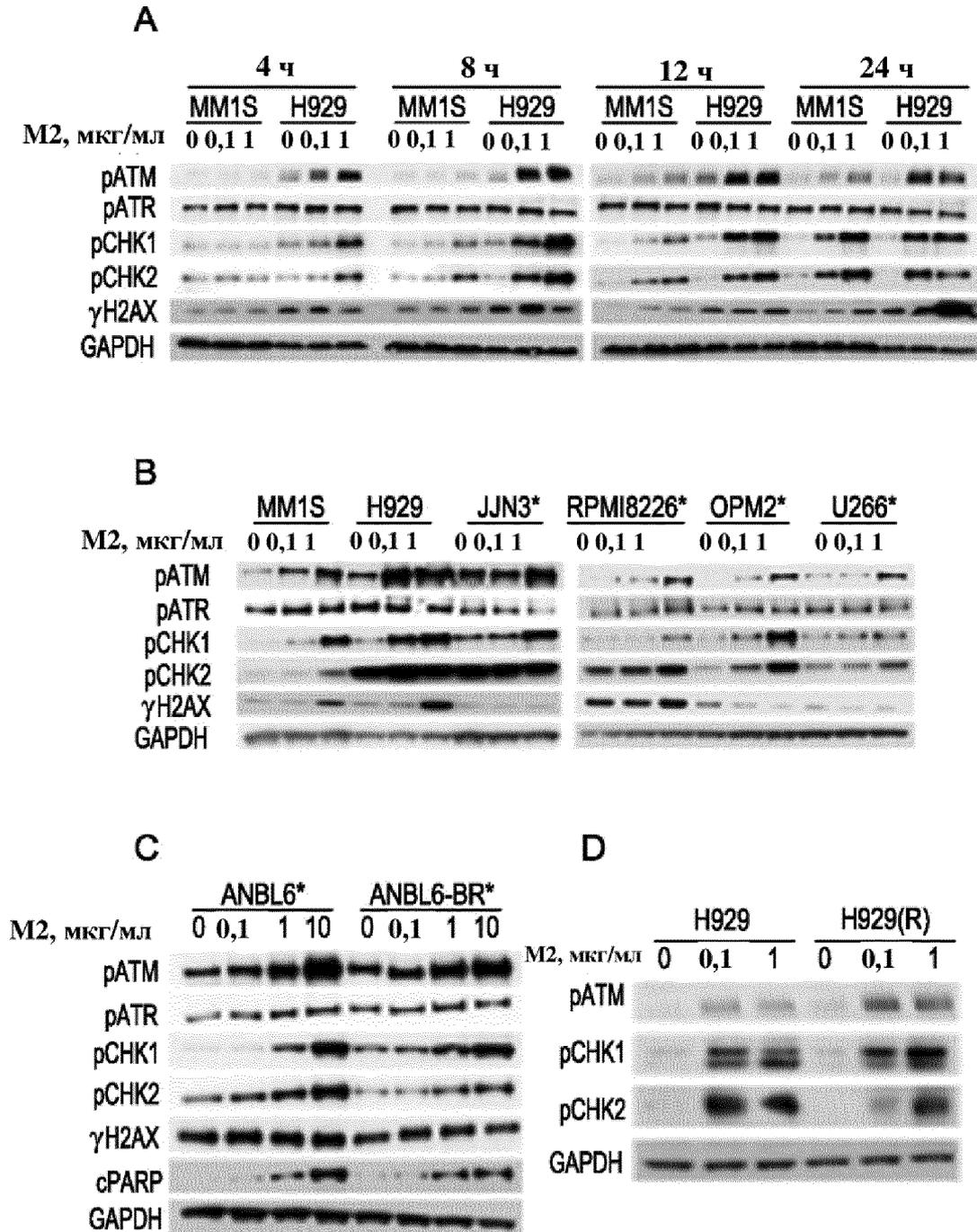
ФИГ. 7



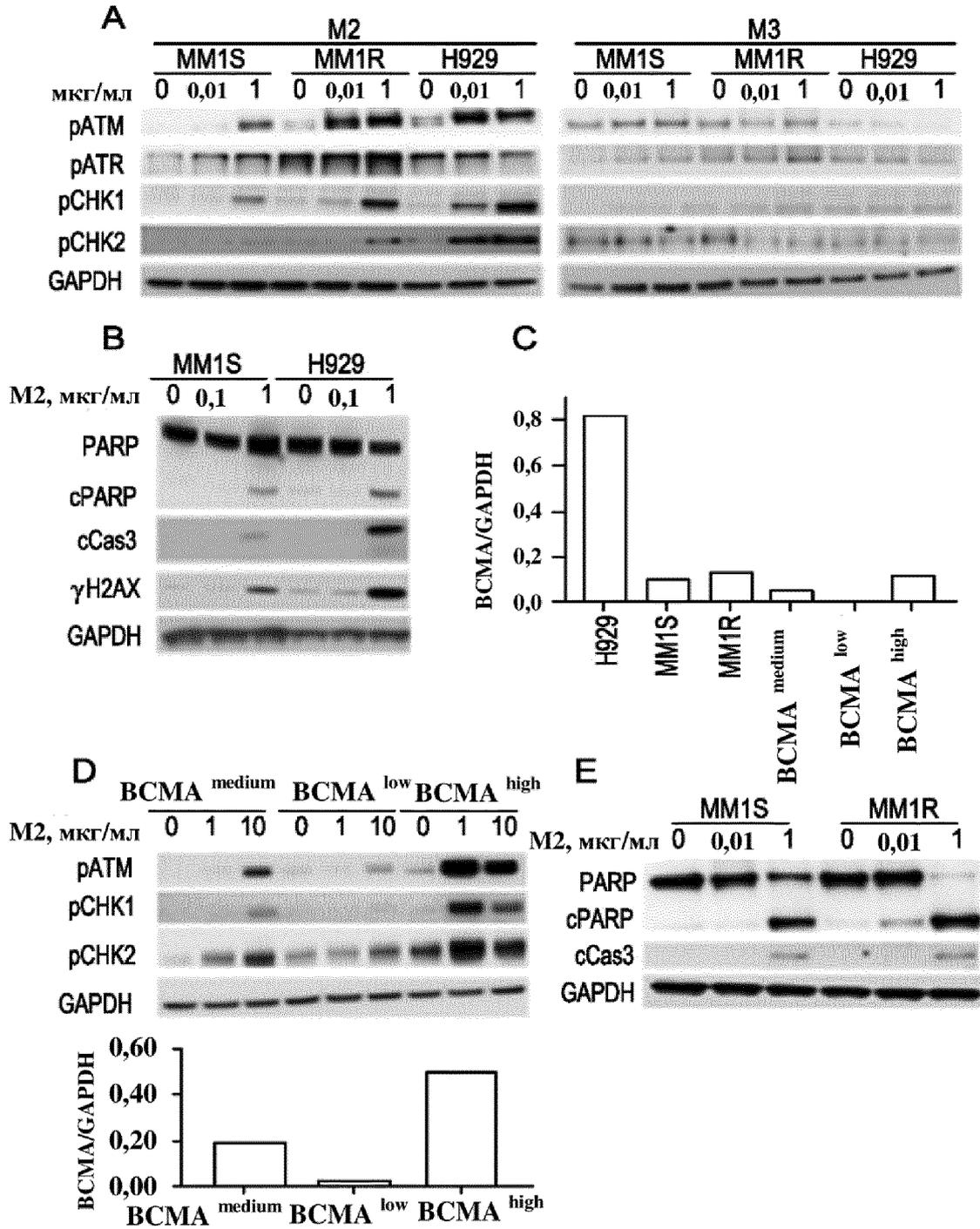
**ФИГ. 8**



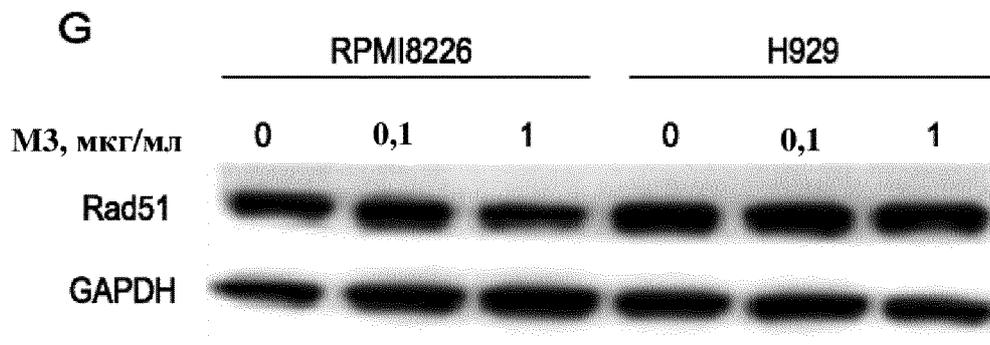
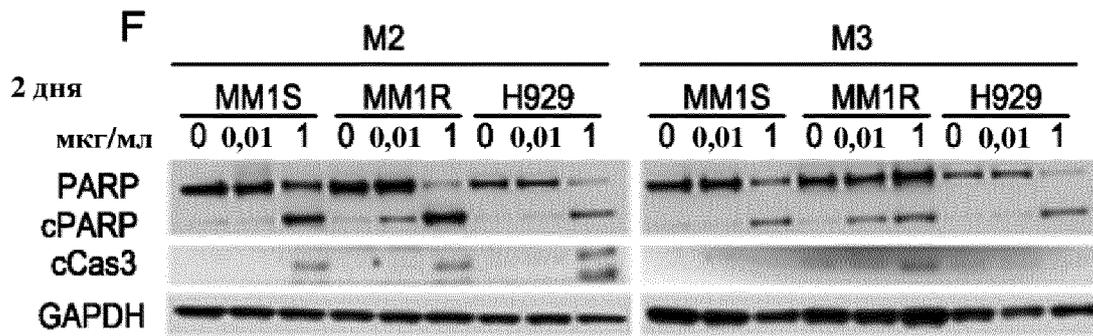
## ФИГ. 9



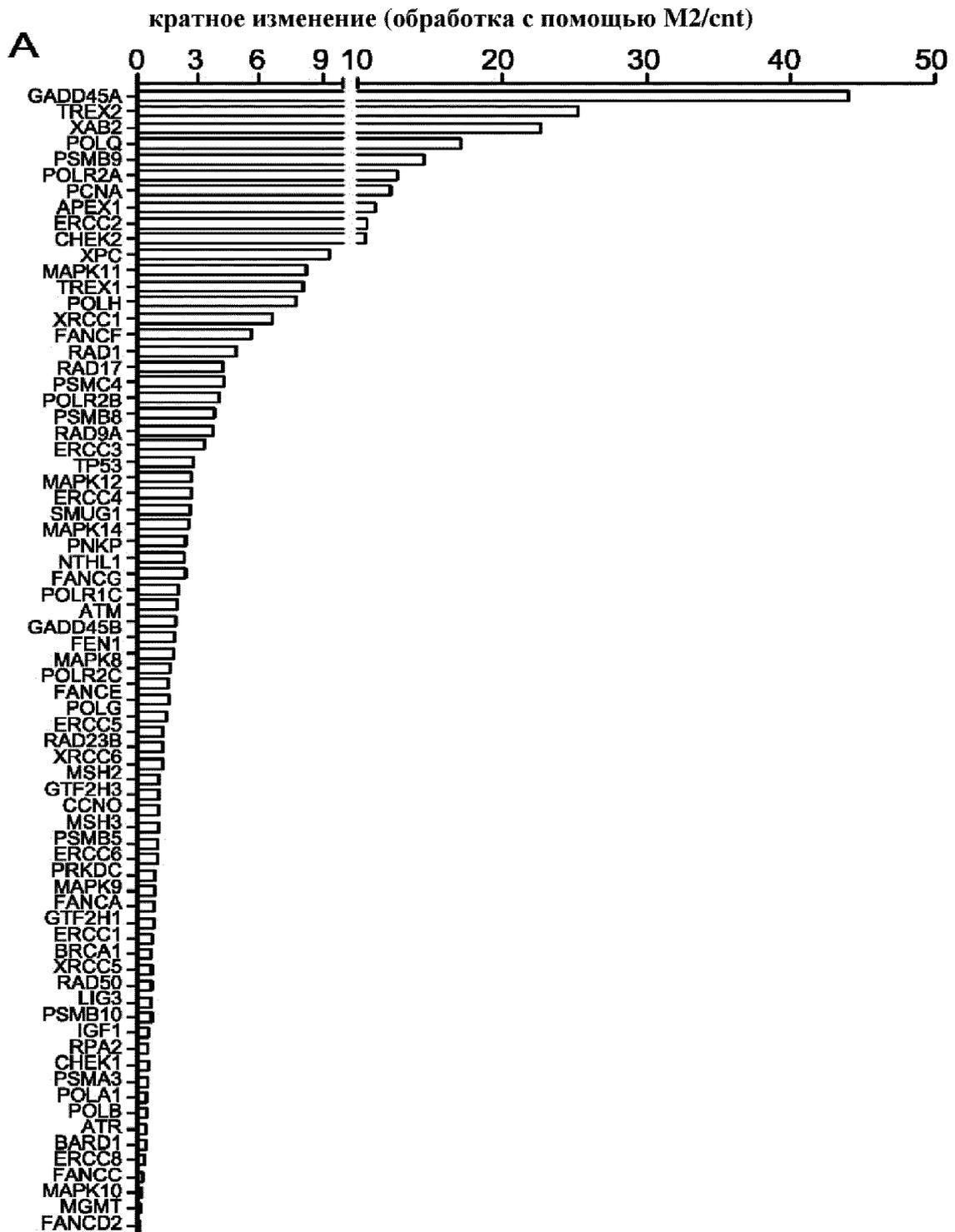
**ФИГ. 10**



ФИГ. 10 (продолжение)



ФИГ. 11



ФИГ. 11 (продолжение)

